Aus dem C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Hemmtypen einiger Inhibitoren der Cholinesterase (EC 3.1.1.8) und Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) Messung bei Substrat-Sättigung und bei Substrat-"Mangel"

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

DETLEV JÄGER

1981

Aus dem C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Hemmtypen einiger Inhibitoren der Cholinesterase (EC 3. 1. 1. 8) und Acetylcholinesterase (EC 3. 1. 1. 7) Messung bei Substrat-Sättigung und bei Substrat-"Mangel"

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

DETLEV JÄGER

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Hopf

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Arwen von Bagh-Saranga

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0018

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1.	Material	9
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-Sättigung	11
2.2.2.	Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-"Mangel"	14
3.	Ergebnisteil	17
3.1.	Klassische Bestimmung des Hemmtyps und der Hemmkonstanten K_i	17
3.1.1.	Hemmung durch Pyridostigmin (Mestinon^R)	17
3.1.2.	Hemmung durch Neostigmin (Prostigmin^R)	21
3.1.3.	Hemmung durch Edrophonium (Tensilon^R)	24
3.1.4.	Hemmung durch Tacrin	26
3.1.5.	Hemmung durch Paraoxon (E 600)	30
3.2.	Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-"Mangel"	36
3.2.1.	Hemmung durch Pyridostigmin (Mestinon^R)	36
3.2.2.	Hemmung durch Neostigmin (Prostigmin^R)	41
3.2.3.	Hemmung durch Edrophonium (Tensilon^R)	42
3.2.4.	Hemmung durch Tacrin	44
3.2.5.	Hemmung durch Paraoxon (E 600)	47
4.	Besprechung der Ergebnisse	51
4.1.	Graphische Analyse der Meßergebnisse der Aktivitätsmessungen im Substratsättigungsbereich	51
4.2.	Hemmtypen und ihr molekularer Mechanismus	58
4.3.	Graphische Analyse der Meßergebnisse der Aktivitätsmessungen im Substrat-"Mangel"-Bereich	65
5.	Zusammenfassung	68
6.	Literaturverzeichnis	71

Erklärung häufig verwendeter Abkürzungen

A	Darstellungsart der Meßergebnisse, bei der $1/v_i$ gegen $1/[S]$ aufgetragen wird (LINEWEAVER-BURK)
AChE	Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7); wenn der Sinnzusammenhang keine andere Deutung zuläßt, ist damit die hier verwendete AChE aus Electrophorus electricus - bezogen von der Firma Boehringer Mannheim - gemeint
(A)ChE	(Acetyl-)Cholinesterase, im Sinne von 'AChE und ChE'
AcThCh	Acetylthiocholin, Substrat der hier verwendeten AChE
B	Darstellungsart der Meßergebnisse, bei der $1/v_i$ gegen [I] aufgetragen wird
BuThCh	Butyrylthiocholin, Substrat der hier verwendeten ChE
C	Darstellungsart der Meßergebnisse, bei der S/v_i gegen [S] aufgetragen wird
ChE	Cholinesterase (EC 3.1.1.8); wenn der Sinnzusammenhang keine andere Deutung zuläßt, ist damit die hier verwendete ChE aus Pferdeserum - bezogen von der Firma Merck, Darmstadt - gemeint
D	Darstellungsart der Meßergebnisse, bei der S/v_i gegen [I] aufgetragen wird
DDVP	Dimethyl-2,2-dichlorvinylphosphat
DFP	Di-isopropylfluorphosphat (Fluostigmin)
DTNB	2,2'-Dinitro-5,5'-dithio-benzoesäure
[E]	Enzymkonzentration
[EI]	Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes
[EIS]	Konzentration des Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplexes
[ES]	Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes
[I]	Inhibitorkonzentration

$I_{k50\%}$ Diejenige Inhibitorkonzentration, bei der unter der Bedingung des Substrat-"Mangels" eine Halbierung der Geschwindigkeitskonstanten k erzielt wird

K_i Inhibitorkonstante, Dissoziationskonstante des [EI]-Komplexes; nach der MICHAELIS-MENTEN-Theorie, die hier als bekannt vorausgesetzt wird, gibt K_i bei Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus diejenige Konzentration des Inhibitors an, bei der die apparente MICHAELIS-Konstante ($K_{m\ app}$) der gehemmten Reaktion doppelt so groß ist wie die MICHAELIS-Konstante der ungehemmten Reaktion; liegt ein nonkompetitiver Antagonismus vor, entspricht K_i derjenigen Inhibitorkonzentration, bei der die Maximalgeschwindigkeit der gehemmten Reaktion ($V_{m\ app}$) halb so groß ist wie die Maximalgeschwindigkeit der nicht gehemmten Reaktion

K_m MICHAELIS-Konstante, Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat; numerisch entspricht die MICHAELIS-Konstante derjenigen Substratkonzentration, bei der die enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft

$K_{m\ app}$ Scheinbare MICHAELIS-Konstante des Enzyms bei Hemmung der Reaktion durch einen kompetitiven Inhibitor

[S] Substratkonzentration

SP Schnittpunkt

TEPP Tetraäthyl-pyrophosphat

v Geschwindigkeit der ungehemmten enzymatischen Reaktion

v_i Geschwindigkeit der gehemmten enzymatischen Reaktion

V_m Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten enzymatischen Reaktion bei Substrat-Sättigung

$V_{m\ app}$ Scheinbare Maximalgeschwindigkeit der gehemmten enzymatischen Reaktion in Anwesenheit eines nonkompetitiven Inhibitors, abzulesen am SP der Geraden gehemmter Reaktionsansätze mit der Ordinate im LINEWEAVER-BURK-Plot

1. Einleitung

Cholinesteraseinhibitoren haben in verschiedenen Bereichen Bedeutung erlangt, und zwar:

1) im medizinischen Bereich in der Ophthalmologie bei der Glaukombehandlung (Physostigmin, Neostigmin, DFP und Paraoxon beispielsweise bewirken als indirekte Parasympathomimetika Kontraktion des M. sphinkter pupillae und des M. ciliaris), in der Anaesthesiologie zur postoperativen Decurarisierung nach Anwendung nichtdepolarisierender Relaxantien vom Curare - Typ, in der Neurologie bei der Behandlung der Myasthenia gravis (Verbesserung der neuromuskulären Erregungsübertragung durch Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration an der motorischen Endplatte);
2) im land- und forstwirtschaftlichen Bereich als Insektizide (beispielsweise Parathion, Nitrostigmin, DDVP), wodurch sie auch umwelttoxikologische Probleme mit sich bringen;
3) im militärischen Bereich als chemische Kampfstoffe (z.B. Sarin, Soman, Tabun).

Gezielte Anwendung, Erfolgskontrolle und umwelttoxikologische Fragestellungen fordern einfache und ausreichend genaue Methoden zur Bestimmung der Esteraseinhibitoren. Die gebräuchlichsten Methoden sind derzeit:

1) die direkte Bestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie:
2a) die indirekte Bestimmung über Esterase-Hemmung im Tierversuch:
2b) die indirekte Bestimmung über Esterase-Hemmung in vitro.

Die unter 2a) genannte Methode dient vor allem der Beantwortung

toxikologischer Fragestellungen.

Mit Hilfe der mit 2b) bezeichneten Methode lassen sich auch kleinste Aktivitätsabnahmen des Enzyms nachweisen. Erweist sich die Esterase-Hemmung als progredient, weil vielleicht ein sog. irreversibler Antagonist oder ein Gemisch verschiedener, nicht näher definierter reversibler und irreversibler Acetylcholinesterase-Antagonisten vorliegen, empfiehlt sich die Auftragung der gemessenen (Rest-)Aktivität gegen die Inkubationsdauer. Im halblogarithmischen Raster zeigt sich im günstigsten Fall eine lineare Abhängigkeit, aus der die Phosphorylierungskonstante als Maß für die Potenz des Hemmstoffs oder des Hemmstoffgemischs ermittelt werden kann (vergl. ALDRIDGE, 1950).

Die bekannteste Methode, eine Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung zu charakterisieren, stellt die graphische Auswertung der Meßergebnisse nach LINEWEAVER-BURK (1934) dar: es können die Maximalgeschwindigkeit V_m der Reaktion, die MICHAELIS-Konstante K_m , die Hemmkonstante K_i und der Hemmtyp (kompetitiv, nonkompetitiv oder unkompetitiv) bestimmt werden. Neben der doppelt reziproken Darstellungsart nach LINEWEAVER-BURK stehen auch andere Auftragungsarten zur graphischen Analyse der Meßergebnisse zur Verfügung (Zusammenstellung bei WEBB, 1963).

Mit den durch den jeweils charakteristischen Kurvenverlauf definierten Hemmtypen werden bestimmte Vorstellungen bezüglich des molekularen Hemm-Mechanismus verknüpft. So soll beispielsweise nach BUDDECKE (1974), COHEN u. OOSTERBAAN (1963), KARLSON (1974), KOROLKOVAS (1974), LEHNINGER (1977), RAPOPORT (1977) und WEBB (1963) kompetitive Hemmung bedeuten: Substrat- und Hemmstoffmolekül konkurrieren um die gleiche Stelle ('active center') am Enzym,

die reversible Wechselwirkung findet entweder zwischen Enzym und Substratmolekül oder zwischen Enzym und Hemmstoffmolekül statt; Konzentrationserhöhung des Agonisten bewirkt Verdrängung des Antagonisten - und umgekehrt; das Gleichgewicht stellt sich augenblicklich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz ein.

Nonkompetitive Inhibition soll bedeuten: das Hemmstoffmolekül reagiert mit dem Enzym an einer Stelle außerhalb des 'aktiven Zentrums' und verzögert durch Deformierung des Enzyms die Enzym-Substrat-Komplexbildung und/oder die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplexes. Diese Effekte können durch Erhöhung der Substratkonzentration nicht aufgehoben werden.

Im Falle der unkompetitiven Hemmung reagiert der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex und bewirkt die Bildung eines inaktiven Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplexes, der nicht weiterreagieren kann; Substratzugabe läßt die Hemmung zunehmen.

Gemessen an diesen strengen Definitionen müßten sämtliche bekannte (Acetyl-)Cholinesterase-Inhibitoren "kompetitive Antagonisten" genannt werden, denn sie konkurrieren bekanntermaßen mit dem Substrat um die gleiche Stelle am Enzym; bei der graphischen Analyse der Meßergebnisse wäre demnach der für den kompetitiven Antagonismus typische Kurvenverlauf zu erwarten. Dies soll unter anderem in dieser Arbeit untersucht werden.

Außerdem ist die Frage zu beantworten, ob und wie die als sogenannte irreversible (A)ChE-Inhibitoren beschriebenen Organophosphate in die Einteilung der reversiblen Hemmtypen passen (KOROLKOVAS (1974) bezeichnet zum Beispiel DFP als typischen nonkompetitiven Antagonisten).

Die Bedeutung und Anwendung der einteilenden Begriffe

reversibel - irreversibel und kompetitiv - nonkompetitiv - unkompetitiv sollen hier kurz in ihrem Wandel und damit in ihrer Mißverständlichkeit dargestellt werden.

Im Gegensatz zu den schon lange bekannten (A)ChE-Hemmstoffen wie den Alkaloiden Prostigmin und Eserin erwiesen sich die hochpotenten Organophosphate in ihrer Wirkung als praktisch irreversible Antagonisten. Bezüglich des molekularen Hemm-Mechanismus vermuteten AUGUSTINSSON u. NACHMANSOHN (1949), daß sowohl die reversiblen als auch die irreversiblen Inhibitoren genau an derjenigen Stelle mit dem Enzym reagierten, an der das auch das Substrat täte. Kriterium der Unterscheidung in reversibel und irreversibel war: bei Esterase-Hemmung durch DFP oder TEPP nahm der Grad der Hemmung mit der Dauer der Inkubationszeit zu, was sich im Diagramm v/v_i gegen [I] im 'parabel'-ähnlichen Kurvenverlauf manifestierte; bei der Hemmung durch Prostigmin oder Eserin blieb der Grad der Inhibition nach einer kurzen Dauer der Instabilität für lange Zeit konstant, im Diagramm v/v_i gegen [I] zeigte sich lineare Abhängigkeit. Die Inhibition der AChE durch Prostigmin oder Eserin wurde als 'kompetitiv' im Sinne einer reversiblen Reaktion des Inhibitors mit dem 'aktiven Zentrum' des Enzyms beschrieben. An dieser Einteilung der Esterase-Inhibitoren in irreversible und reversibel-kompetitive wurde vorerst festgehalten (vergleiche ALDRIDGE, 1950; WILSON u. BERGMANN, 1950). NACHMANSOHN u. WILSON (1951) sprechen auch von der "kompetitiven Natur der Inhibition beider Typen von Hemmstoffen".

Die Irreversibilität der Organophosphat-Wirkung erwies sich jedoch als fragwürdig: nachdem nach erfolgreicher Inkubation von

Enzym und Inhibitor die überschüssige Hemmstoffmenge eliminiert worden war, ließ sich während der nächsten Tage eine Reaktivierung des Enzyms bis zu 6o % der ursprünglichen Aktivität nachweisen (WILSON, 1953; DAVISON, 1953; ALDRIDGE u. DAVISON, 1953). Die Autoren sahen in ihren Ergebnissen eine Bestätigung der Phosphorylierungstheorie: die enzymatische Hydrolyse des Organophosphats entspricht prinzipiell der enzymatischen Hydrolyse des Acetylcholins; der Schritt der Dephosphorylierung dauert nur sehr viel länger als der analoge Schritt der Deacetylierung. Trotz dieser Erkenntnis wurde bezüglich der Organophosphate weiterhin von "irreversiblen AChE-Inhibitoren" geredet, selbst wenn in derselben Veröffentlichung von sehr langsamer Dephosphorylierung (d.h. Reaktivierung) des Enzyms berichtet wurde (vergl. z.B. KEWITZ et al., 1956; WILSON et al., 1958).

196o und 1961 unterstützten WILSON et al. eine schon früher von MYERS u. KEMP (1954) formulierte Hypothese, nach welcher bei Esterase-Hemmung durch Carbaminsäureester die Schritte der Carbamoylierung und Decarbamoylierung denen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Enzyms entsprechen sollten. Wie bei Organophosphat-Hemmung war nach ihren Messungen der Grad der Hemmung von der Inkubationsdauer des Enzyms mit dem Inhibitor abhängig; ein Gleichgewicht ('steady state') stellte sich je nach Wahl der Inhibitorkonzentration erst nach mehrstündiger Inkubation ein (MYERS, 1956). Im Zustand des 'steady state' sollte die Carbamoylierungsrate dann der Decarbamoylierungsrate entsprechen (WILSON et al., 196o). Im Unterschied zur Organophosphat-Hemmung vollzog sich die messbare Reaktivierung des Enzyms nach Carbamat-Hemmung bedeutend schneller. WILSON et al. (196o) zählten die

Carbaminsäureester nach diesen Beobachtungen konsequenterweise zu den irreversiblen (A)ChE-Antagonisten; die meisten Autoren klassifizierten jedoch weiterhin: Organophosphate hemmen irreversibel bzw. 'irreversibel', Carbaminsäureester hemmen reversibel und kompetitiv, wobei 'reversibel' und 'kompetitiv' praktisch synonym verstanden werden. Als Unterscheidungskriterium diente unter anderem auch die mögliche oder unmögliche Reaktivierbarkeit des inhibierten Enzyms nach Verdünnung des Ansatzes.

Inzwischen herrscht Übereinstimmung darüber, daß sich die enzymatische Hydrolyse von Acetylcholin, Carbaminsäureestern und Organophosphaten in analogen Schritten vollzieht: reversible Komplexbildung, dann Acylierung des esteratischen Zentrums, schließlich Deacylierung (siehe Graphik bei KOELLE, 1971); Affinitätskonstante (Komplexbildungskonstante) und Acylierungskonstante können nach der Methode von MAIN (1964) bestimmt werden. Während die Organophosphate übereinstimmend zu den (sogenannten) irreversiblen (A)ChE-Hemmstoffen gerechnet werden, finden sich die Carbaminsäureester bei COHEN u. OOSTERBAAN (1963) in der Tabelle für reversible, bei USDIN (197o) oder IVERSON (1976) in der Tabelle für irreversible Antagonisten.

In älteren, gelegentlich aber auch in jüngeren Arbeiten wird 'kompetitiv' im Zusammenhang mit reversiblen Inhibitoren explizit oder implizit im Sinne von 'Konkurrenz mit dem Substrat um die gleiche Stelle am Enzym' verstanden. Diejenigen Autoren, die die Ergebnisse ihrer Aktivitätsmessungen nach LINEWEAVER-BURK oder DIXON auswerteten, erhielten Graphiken, die bei Esterase-Hemmung durch carbamoylierende Inhibitoren Kompetition, Nonkompetition oder einen Mischtyp anzeigten (FELLMAN u. FUJITA, 1964; SCHMIDT

et al., 1977). Es stellt sich hier wieder die Frage, wie das Wissen um den molekularen Hemm-Mechanismus mit den oben beschriebenen Vorstellungen bezüglich der einzelnen Hemmtypen zu vereinbaren ist.

Es ist üblich, einem zu bestimmenden Enzym Substrat im Überschuß anzubieten. Wird die Substratkonzentration bei den hier verwendeten Esterasen unter 10^{-4} M gesenkt, erfolgt die enzymatische Hydrolyse des Substrats gemäß einer Halbwertszeit, die sich als unabhängig von der Startkonzentration $[S]_o < 10^{-4}$ M erweist. DROSS (1977) bestimmte die Konstante k dieser Reaktion 1. Ordnung und zeigte ihre Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration.

Diese Methode der Aktivitätsmessung, mit deren Randbedingungen physiologische Verhältnisse etwas besser simuliert werden, soll in ihrer Aussagekraft und Leistungsfähigkeit mit der klassischen Bestimmungsmethode verglichen werden.

Zusammengefaßt sollen in dieser Arbeit folgende Fragen bearbeitet werden:

1) Wie eindeutig lassen die verschiedenen graphischen Analysemethoden die Bestimmung der Konstanten K_m, V_m, K_i und des Hemmtyps zu?
2) Welche Hemmtypen liegen nach der graphischen Analyse der (A)ChE-Aktivitätsmessungen bei Substrat-Sättigung vor?
3) Wie können die eigenen Ergebnisse bezüglich des graphisch festgestellten Hemmtyps zusammen mit den in der Literatur beschriebenen mit den allgemein verbreiteten Vorstellungen von den molekularen Mechanismen der Enzym-Hemmung vereinbart werden?

4) Welche Ergebnisse liefert die Auswertung der Aktivitätsmessung unter der Bedingung des Substrat-"Mangels" bezüglich der Konstanten und des Hemmtyps?

5) Bei welchen Fragestellungen ist die Methode der Aktivitätsmessung bei Substrat-"Mangel" und ihre spezielle Auswertung der klassischen Methode überlegen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Acetylcholinesterase (AChE) aus Electrophorus electricus wurde von der Firma Boehringer Mannheim, Cholinesterase (ChE) aus Pferdeserum und 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiobenzoesäure (DTNB) wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

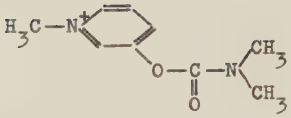
Die Hemmstoffe Neostigmin (Prostigmin^{R}), Pyridostigmin (Mestinon^{R}) und Edrophonium (Tensilon^{R}) stammten von der Firma Hoffmann - La Roche, Wyhl; die Hemmstoffe Tacrin und Paraoxon (E 6oo), sowie die Substrate Acetylthiocholin-jodid (AcThCh) und Butyrylthiocholin-jodid (BuThCh) von der Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg. - Strukturformeln der Inhibitoren siehe S. 1o.

2.2. Methoden

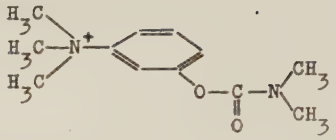
Die Bestimmung der Esterasen erfolgte nach der Methode von ELLMANN et al. (1961): dem Enzym wird ein Thiocholinester als Substrat angeboten; DTNB reagiert mit der SH-Gruppe des Spaltprodukts Thiocholin; die Farbstoffbildung wird als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen.

Als Medium diente 1/15 molarer Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,o mit einem Zusatz von o,1 Mol/l NaCl und o,o2 Mol/l $MgCl_2$. Die beiden Stammlösungen des Puffers wurden einmal wöchentlich frisch hergestellt und bei +4° C gelagert; aus ihnen wurde die für die Experimente benötigte Puffermenge täglich neu zubereitet und im Wärmeblock bei +25° C aufbewahrt.

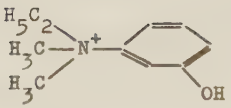
Stammlösungen für Enzym, Substrat, Reagenz und Inhibitor



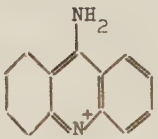
Pyridostigmin



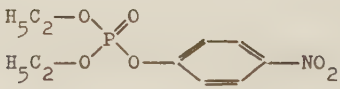
Neostigmin



Edrophonium



Tacrin



Paraoxon

Abb. 2-1: Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren Pyridostigmin (Mestinon^{R}), Neostigmin (Prostigmin^{R}), Edrophonium (Tensilon^{R}), Tacrin und Paraoxon (E 6oo).

wurde zu jedem Versuchstag frisch angesetzt und bei +4° C bzw. 0° C (Enzym) aufbewahrt; die Erwärmung der daraus hergestellten Gebrauchslösungen unterschiedlicher Konzentrationen erfolgte kurz vor Gebrauch im Wärmeblock, nur die Enzymlösung blieb bis zum Zeitpunkt des Pipettierens im Eisbad.

2.2.1. Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-Sättigung

In Einmal-Plastikküvetten wurde pipettiert: je nach Konzentration 2o - 4o µl eisgekühlte Enzymlösung, so daß die Aktivität pro Ansatz ca. o,1 (AChE) bzw. o,o3 U (ChE) betrug; 25o µl vorgewärmte Hemmstoff-Gebrauchslösung (Konzentrationen siehe Kap. 3.1.); 25° C warmer Puffer ad 245o µl. Die Referenzküvetten enthielten nur Enzymlösung und Puffer ad 245o µl. Waren Inkubationszeiten vorgesehen, diente der Wärmeblock zur Stabilisierung der Temperatur des Küvetteninhaltes. Unmittelbar vor dem Start der Reaktion durch Zugabe von 25 µl Substratlösung (Konzentrationen siehe Kap. 3.1.) wurden 25 µl DTNB (Endkonzentration o,1 mg/ml) pipettiert.

Zur photometrischen Bestimmung bei 412 nm diente das Spektralphotometer Zeiss PMQ II, verbunden mit einem Transmissions-Extinktionswandler 'Universal Digital Printer - Model 45o' (Bio-Tech) der die Extinktionswerte in 15-Sekunden-Abständen ausdruckte. Die Registrierung erfolgte jeweils über 5 min.

Aus der gemessenen Extinktionszunahme ΔE pro Minute konnten mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 13{,}6 \times 10^4$ cm^2/Mol die Reaktionsgeschwindigkeiten v bzw. v_i errechnet werden.

Entsprechend den Vorschlägen von WEBB (1963) erfolgte die

graphische Darstellung und Analyse der Meßergebnisse auf vier verschiedene Arten, die im Verlauf dieser Arbeit durch die Buchstaben A bis D gekennzeichnet sind; und zwar:

1/Geschwindigkeit	gegen	1/Substratkonz.	(A),
1/Geschwindigkeit	gegen	Inhibitorkonz.	(B),
Substratkonz./Geschwindigkeit	gegen	Substratkonz.	(C),
Substratkonz./Geschwindigkeit	gegen	Inhibitorkonz.	(D).

Der Verlauf der Geraden wurde mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms ermittelt. Ihre Schnittpunkte untereinander, Abszissen- und Ordinatenabschnitte, ferner die Steigungen der Geraden dienten zur Bestimmung des Hemmtyps und der Konstanten K_m, V_m und K_i. Benutzt man für die gleichen Meßergebnisse mehrere Darstellungsarten, sollen nach WEBB (1963) die Graphen eindeutig einem bestimmten Hemmtyp zugeordnet werden können. Über den charakteristischen Verlauf der Geraden in den Darstellungen A bis D bei Vorliegen eines bestimmten Hemmtyps informiert die Tab. 2-1.

Soll der Verlauf jeder Geraden durch wenigstens drei Meßpunkte gesichert werden, sind drei verschiedene Substratkonzentrationen und drei verschiedene Inhibitorkonzentrationen plus einem Leerwert (Ansatz ohne Hemmstoff) zu wählen. Damit stehen für die Auswertung $3 \times (3+1) = 12$ Meßpunkte zur Verfügung. Da jeder Meßpunkt in dieser Arbeit durch Dreifachbestimmung gesichert werden sollte, waren in jedem Versuch mindestens 36 Messungen durchzuführen.

In der soeben beschriebenen Weise erfolgten auch Messung und Auswertung bei (A)ChE-Hemmung durch den sogenannten irreversiblen Inhibitor Paraoxon. Zuvor wurde allerdings die Abhängigkeit

Hemmtyp	ungehemmt	kompetitiv	nonkompetitiv	gemischt
Auftragung A				
O-Abschnitt	$1/V_m$	$1/V_m$		
A-Abschnitt	$-1/K_m$		$-1/K_m$	
SP bei x = ?		0	$-1/K_m$	$-1/\alpha K_m$
Auftragung B				
A-Abschnitt			$-K_i$	
SP bei x = ?		$-K_i$	$-K_i$	$-K_i$
Auftragung C				
A-Abschnitt	$-K_m$		$-K_m$	
Steigung	$1/V_m$	$1/V_m$		
SP bei x = ?		Parallelität	$-K_m$	$-\alpha K_m$
Auftragung D				
A-Abschnitt			$-K_i$	
SP bei x = ?		Parallelität	$-K_i$	$-\alpha K_i$

Tabelle 2-1: 'Differentialdiagnostische Tabelle' zur Bestimmung des Hemmtyps bei Anwendung der Auftragungsarten A bis D. Eingetragen sind nur 'einfache' Terme mit einer Konstanten. Es bedeuten: O bzw. A-Abschnitt: Ordinaten- bzw. Abszissenabschnitt; SP: Schnittpunkt sämtlicher Geraden.

der Enzymaktivität von der Dauer der Vorinkubation mit dem Hemmstoff untersucht. Die Abnahme der Aktivität kann durch $E_t = E_o \times e^{-k[I]t}$ beschrieben werden (WEBB, 1963); danach gilt

$k = (1/[I]t) \times \ln (E_o/E_t)$ zum Zeitpunkt t; $k = \ln 2 \cdot / [I]t_{o,5}$ zum Zeitpunkt $t_{o,5}$, der Halbwertszeit der Aktivität. Die Phosphorylierungskonstante k (Dimension: M^{-1} min^{-1}) und/oder die Halbwertszeit dienen zur Charakterisierung eines sogenannten irreversiblen Inhibitors; $t_{o,5}$ wurde nach Darstellung der Meßergebnisse im halblogarithmischen Raster - Logarithmus der prozentualen Restaktivität gegen Inkubationsdauer - graphisch ermittelt (vergl. ALDRIDGE, 1950); der exakte Verlauf der Geraden wurde mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms bestimmt.

2.2.2. Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-"Mangel"

20 - 40 µl eisgekühlte Enzymlösung , deren Aktivität bei ca. 0,3 (AChE) bzw. 0,1 U (ChE) lag, 250 µl vorgewärmte Inhibitorgebrauchslösung (Konzentrationen siehe Kap. 3.2.) und +25° C warmer Puffer ad 2450 µl wurden in eine Einmal-Plastikküvette pipettiert. Die Referenzküvetten enthielten nur Enzymlösung und Puffer ad 2450 µl. Sollte das Enzym mit dem Inhibitor vorinkubiert werden, diente der Wärmeblock zur Stabilisierung der Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl Substratlösung (Endkonzentration $< 10^{-4}$ M) nach dem Pipettieren von 25 µl DTNB (Endkonzentration 0,01 mg/ml) gestartet.

Die Messung erfolgte mit den in Kap. 2.2.1. genannten Geräten bei 412 nm; ausgedruckt wurden diesmal die gemessenen Transmissionswerte in Abständen von 15 Sekunden. Innerhalb von 4 - 6 Minuten hydrolysierten die Esterasen die geringe Substratmenge vollständig: die abnehmenden Transmissionswerte näherten sich asymptotisch einem Endwert.

Jeweils acht aufeinanderfolgende Transmissionswerte und der Endwert wurden dem Rechner (HP 9825) eingegeben, der mit Hilfe eines entsprechenden Programms die Umrechnung in Extinktion vornahm und die jeweiligen Differenzen zum Endwert bildete. Werden diese Differenzbeträge halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich aufgrund exponentieller Abnahme der Substratkonzentration (Reaktionskinetik 1. Ordnung) eine lineare Beziehung. Der Verlauf dieser Geraden wurde mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms über Fehlerquadrate ermittelt; ausgedruckt wurden Korrelationskoeffizient, Standardabweichung, Steigung und Ordinatenabschnitt, außerdem die Y-Koordinate für den Endwert der Reaktion. Im Idealfall sollte diese Endwert-Koordinate mit dem ausgedruckten Ordinatenabschnitt der Geraden übereinstimmen, der Korrelationskoeffizient bei $> o,98$ liegen. Durch geringfügige Variation des gemessenen Endwertes, dem man sich ja asymptotisch genähert hatte, veränderten sich sämtliche anderen Parameter, so daß auf diese Weise der Verlauf der Geraden optimiert werden konnte. Die berechnete Steigung der Geraden stellt die Geschwindigkeitskonstante k (Dimension: min^{-1}) der untersuchten Reaktion 1. Ordnung dar.

Wird bei Enzymhemmung die relative Abnahme des k-Wertes gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen, so stellt sich eine lineare Beziehung dar. Steigungen und Achsenabschnitte der auf diese Weise produzierten Geraden sollen sich dabei als unabhängig von der Substratkonzentration erweisen, wenn sie nur ausreichend klein ist (vergl. DROSS, 1977).

Wie bei den Aktivitätsmessungen unter der Bedingung Substrat-Sättigung wurden auch bei der Bestimmung unter Substrat-"Mangel" jeweils wenigstens drei verschiedene Substratkonzentrationen und

wenigstens drei verschiedene Inhibitorkonzentrationen zuzüglich eines Ansatzes ohne Hemmstoff gewählt. Somit standen mindestens 3 x (3+1) = 12 Meßpunkte zur Verfügung, waren bei Dreifachbestimmung mindestens 36 Einzelmessungen durchzuführen.

3. Ergebnisteil

3.1. Klassische Bestimmung des Hemmtyps und der Hemmkonstanten K_i

3.1.1. Hemmung durch Pyridostigmin (Mestinon^R)

AChE wurde 2 1/2 Stunden lang mit dem Inhibitor Pyridostigmin, der in Konzentrationen von $6{,}25 \times 10^{-7}$, $1{,}25 \times 10^{-6}$ und $2{,}5 \times 10^{-6}$ Mol/l vorlag, vorinkubiert. Bei Start der Reaktion betrug die Substratkonzentration (AcThCh) 0,25 , 0,5 und 1,0 mMol/l.

In der Abb. 3-1 sind die Meßergebnisse auf vier verschieden Weisen dargestellt worden. Es ist nicht möglich, den Hemmtyp nur anhand der Auftragungsart nach LINEWEAVER-BURK (A) zu bestimmen: ein Schnittpunkt zweier Geraden liegt auf der Abszisse (nonkompetitiver Antagonismus?), zwei Schnittpunkte liegen im II. Qudranten, was für einen gemischten Antagonismus spräche. In den Darstellungen B, C, und D der Abb. 3-1 schneiden sich sämtliche Geraden jeweils in einem Punkt auf der Abszisse. Dies weist nach WEBB (1963) auf das Vorliegen eines nonkompetitiven Antagonismus hin.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse in B und D ist $-K_i$ (vergl. auch Tab. 2-1). Diese Konstante wurde zu $1{,}22 (\pm 0{,}43) \times 10^{-6}$ Mol/l (B) bzw. $1{,}05 (\pm 0{,}10) \times 10^{-6}$ Mol/l (D) bestimmt. Die Berechnung des K_i aus den Steigungen der Geraden in C ergab den Wert $1{,}09 (\pm 0{,}07) \times 10^{-6}$ Mol/l.

Liegt ein nonkompetitiver Antagonismus vor, kann die

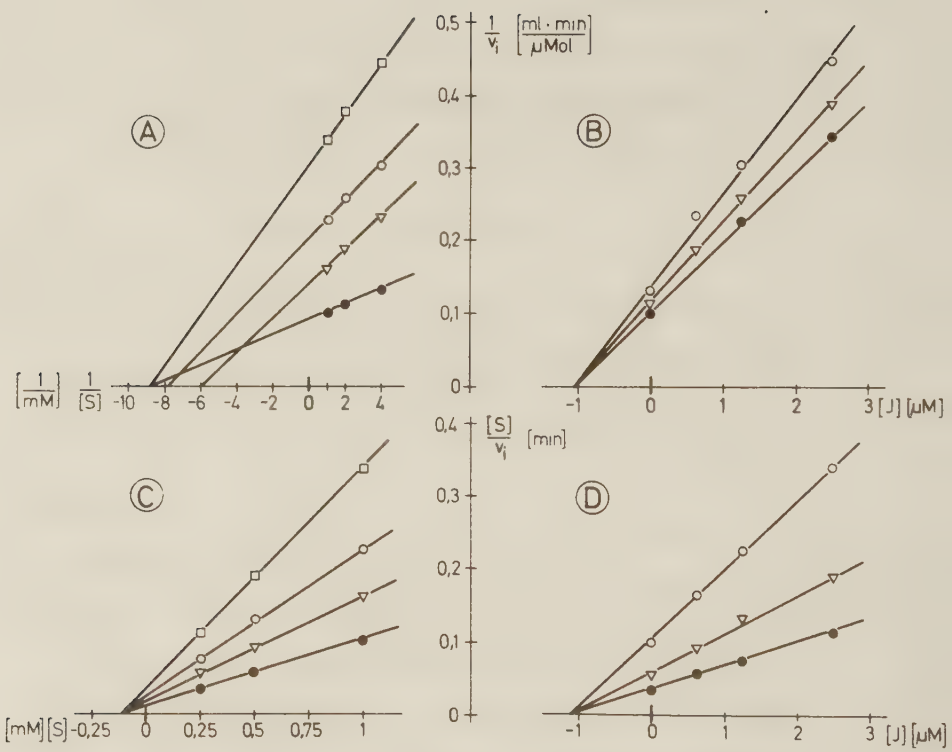


Abb. 3-1: Hemmung der AChE durch Pyridostigmin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Der Verlauf der Geraden ist mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms berechnet worden. Vorinkubation 2 1/2 h.

A u. C: • Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 6,25 x 10^{-7} , ○ 1,25 x 10^{-6} , □ 2,5 x 10^{-6} M.

B u. D: Substratkonz. • 0,25 , ▽ 0,5 , ○ 1,0 mM.

MICHAELIS-Konstante K_m aus dem gemeinsamen Schnittpunkt sämtlicher Geraden mit der Abszisse in A und C bestimmt werden. Der aus den Geraden in A errechnete Wert für K_m zeigt mit 1,32 ($\pm$ o,57) x $1o^{-4}$ Mol/l eine mehr als doppelt so große Standardabweichung wie der zu 1,26 ($\pm$ o,23) x $1o^{-4}$ Mol/l aus den Geraden in C errechnete. Die Werte für die Maximalgeschwindigkeit V_m stimmen mit 11,11 mMol/lmin aus A (1/Ordinatenabschnitt der Geraden der Meßergebnisse ungehemmter Ansätze) und 11,o3 mMol/lmin aus C (1/Steigung der Geraden der Meßergebnisse ungehemmter Ansätze) gut überein.

Nach 2 1/2 - stündiger Vorinkubation der ChE mit Pyridostigmin in den Konzentrationen 3,125 x $1o^{-7}$, 6,25 x $1o^{-7}$ und 1,25 x $1o^{-6}$ Mol/l wurde die Reaktion durch Zugabe von BuThCh gestartet. Die Substratkonzentrationen betrugen 1, 2, 4 und 8 mMol/l.

Schon die Darstellung der Meßergebnisse nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 3-2,A) läßt vermuten, daß es sich hier um einen nonkompetitiven Antagonismus handelt: sämtliche Geraden schneiden sich in einem Punkt auf der Abszisse. Auch die drei anderen Graphiken der Abb. 3-2 zeigen die nach WEBB (1963) für den nonkompetitiven Hemmtyp charakteristischen Kurververläufe.

K_i konnte aus den Abszissenabschnitten der Geraden in B und D zu 9,27 ($\pm$ 1,51) x $1o^{-7}$ Mol/l (B) bzw. 8,59 ($\pm$ 1,69) x $1o^{-7}$ Mol/l bestimmt werden. Die Berechnung des K_i aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in C ergab stärker streuende Werte: 9,93 ($\pm$ 3,4o) x $1o^{-7}$ Mol/l bzw. 7,91 ($\pm$ 2,16) x $1o^{-7}$ Mol/l.

Zur Bestimmung der Konstanten K_m und V_m dienten wieder die

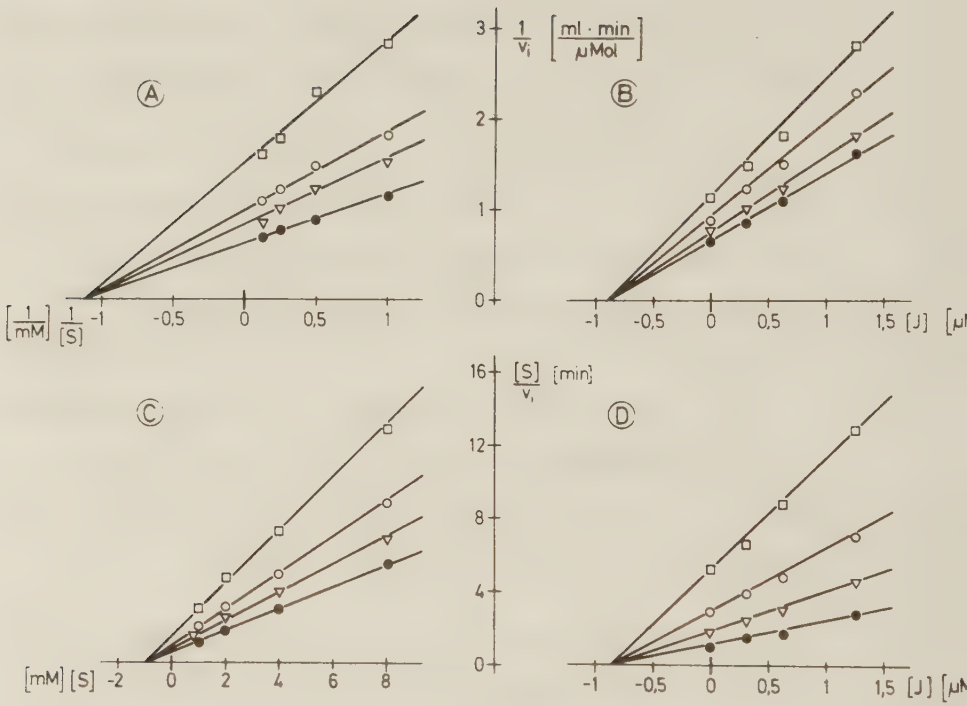


Abb. 3-2: Hemmung der ChE durch Pyridostigmin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Vorinkub. 2 1/2 h.
A u. C: • Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 3,125 x $1o^{-7}$, ○ 6,25 x $1o^{-7}$, □ 1,25 x $1o^{-6}$ M.
B u. D: Substratkonz. • 1, ▽ 2, ○ 4, □ 8 mM.

Geraden in den Darstellungsarten A und C. Danach ergaben sich für K_m die Werte 9,61 (± 1,3o) x $1o^{-4}$ Mol/l (A) und 1o,71 (± 1,51) x $1o^{-4}$ Mol/l (C). Die Maximalgeschwindigkeit V_m errechnete sich zu 1,6o mMol/lmin (A) bzw. 1,63 mMol/lmin (C).

3.1.2. Hemmung durch Neostigmin (Prostigmin^R)

Wie bei der Inhibition durch Pyridostigmin wurde auch bei der AChE-Hemmung durch Neostigmin eine 2 1/2 - stündige Vorinkubationszeit eingehalten. Der Hemmstoff lag dabei in Konzentrationen von 7,813 x $1o^{-9}$, 1,563 x $1o^{-8}$, 3,125 x $1o^{-8}$, 6,25 x $1o^{-8}$ und 1,25 x $1o^{-7}$ Mol/l vor. Für das Substrat AcThCh wurden die Konzentrationen zu o,25 , o,5 und 1,o mMol/l gewählt.

Auch in diesem Fall kann anhand der Darstellung der Meßergebnisse nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 3-3,A) der Hemmtyp nicht eindeutig ermittelt werden: die Schnittpunkte der Geraden untereinander liegen weit gestreut im II. und III. Quadranten. Allerdings zeigt der Verlauf der Geraden in Abb. 3-3,B-D das Vorliegen eines nonkompetitiven Antagonismus an: sämtliche Geraden schneiden sich jeweils in einem Punkt auf der Abszisse.

Die MICHAELIS-Konstante K_m konnte zu 2,o4 ($\pm$ o,45) x $1o^{-4}$ Mol/l (A) bzw. 2,14 ($\pm$ o,25) x $1o^{-4}$ Mol/l (C) bestimmt werden. Für die Maximalgeschwindigkeit V_m ließen sich aus den Meßergebnissen ungehemmter Ansätze die Werte 8,67 mMol/lmin (A) und 8,52 mMol/lmin (C) errechnen.

Schnittpunkte und Abszissenabschnitte in B und D der Abb. 3-3 dienten zur K_i-Bestimmung. Danach beträgt K_i 2,2o ($\pm$ o,25) x $1o^{-8}$ Mol/l (B) bzw. 2,18 ($\pm$ o,13) x $1o^{-8}$ Mol/l (D). Die Berechnung des K_i aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in Abb. 3-3,C lieferte die Werte 2,17 ($\pm$ o,4o) x $1o^{-8}$ Mol/l und 1,33 ($\pm$ o,33) x $1o^{-8}$ Mol/l.

ChE und Inhibitor in den Konzentrationen 1,25 x $1o^{-8}$, 2,5 x $1o^{-8}$ und 5 x $1o^{-8}$ Mol/l wurden 2 1/2 Stunden lang vorinkubiert.

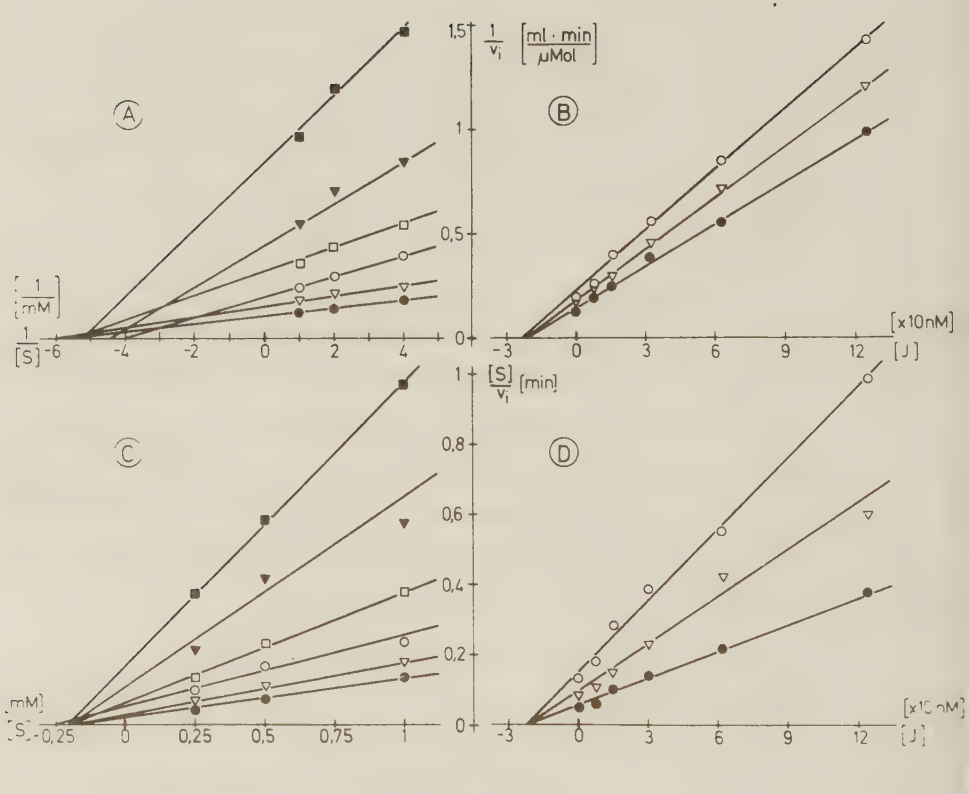


Abb. 3-3: Hemmung der AChE durch Neostigmin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Vorinkub. 2 1/2 h.
A u. C: ● Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 7,813 x 10^{-9} , ○ 1,563 x 10^{-8} , □ 3,125 x 10^{-8} , ▼ 6,25 x 10^{-8} , ■ 1,25 x 10^{-7} M.
B u. D: Substratkonz. ● 0,25 , ▽ 0,5 , ○ 1,0 mM.

Die Substratkonzentration (BuThCh) betrug bei Start der Reaktion 2, 4 und 8 mMol/l.

Nach der graphischen Analyse der Meßergebnisse (s. Abb. 3-4) ist der Antagonismus zwischen ChE und Neostigmin als nonkompetitiv

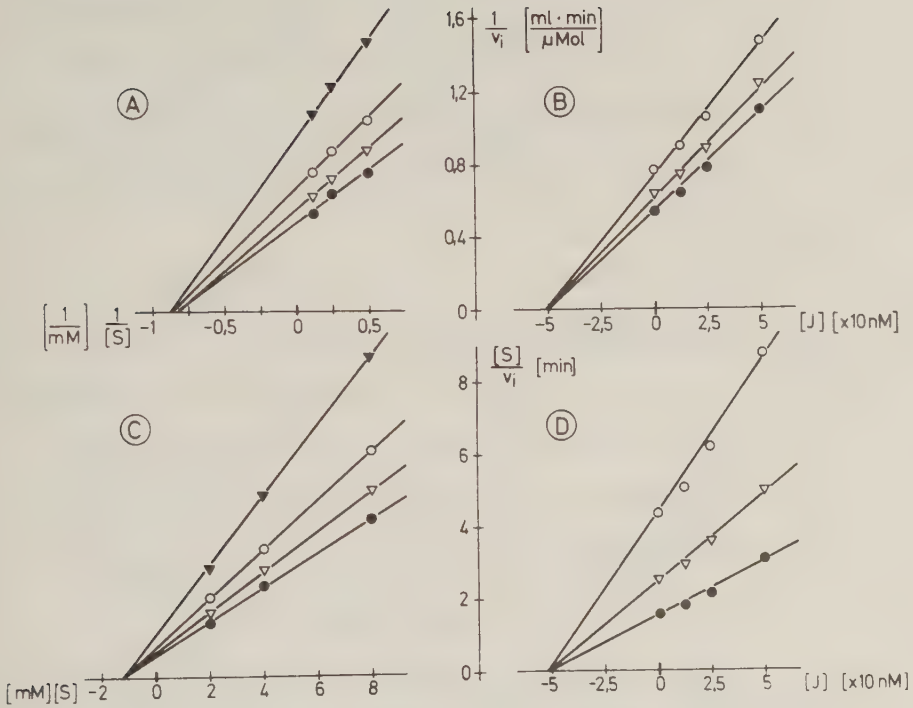


Abb. 3-4: Hemmung der ChE durch Neostigmin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Vorink. 2 1/2 h.
A u. C: • Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 1,25 x 10^{-8} , ○ 2,5 x 10^{-8} , ▼ 5 x 10^{-8} M.
B u. D: Substratkonz. • 2, ▽ 4, ○ 8 mM.

zu bezeichnen.

Die Werte für K_m und V_m stimmen mit 1,15 (± 0,19) x 10^{-3} Mol/l (A) bzw. 1,17 (± 0,12) x 10^{-3} Mol/l (C) und 2,11 mMol/lmin (A) bzw. 2,05 mMol/lmin (C) jeweils gut miteinander überein.

Aus den Schnittpunkten der Geraden in den Darstellungsarten B und D (Abb. 3-4) konnte K_i zu 5,o6 (± o,o8) x $1o^{-8}$ Mol/l (B) bzw. 4,97 (± o,1o) x $1o^{-8}$ Mol/l (D) bestimmt werden. Die Berechnung der Hemmkonstanten aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in der Darstellungsart C ergab Werte, die eine große Streuung aufwiesen: 5,65 (± o,73) x $1o^{-8}$ Mol/l und 6,28 (± 1,64) x $1o^{-8}$ Mol/l.

3.1.3. Hemmung durch Edrophonium (Tensilon^R)

Sofort nach Durchmischen von Enzymlösung (AChE) und Inhibitor erwies sich der Grad der Hemmung als maximal; auf eine Vorinkubation des Enzyms mit dem Hemmstoff wurde deshalb verzichtet. Die Inhibitorkonzentrationen betrugen 3,125 x $1o^{-7}$, 6,25 x $1o^{-7}$ und 1,25 x $1o^{-6}$ Mol/l; die AcThCh-Konzentrationen wurden zu o,125 , o,25 , o,5 und 1,o mMol/l gewählt.

In der Darstellung der Meßergebnisse nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 3-5,A) zeigen sämtliche Geraden nahezu den gleichen Ordinatenabschnitt; ihre Schnittpunkte untereinander liegen dicht an der Ordinate im I. oder II. Quadranten. Dies spricht für das Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus, doch überrascht die große numerische Streuung der Ordinatenabschnitte ($\hat{=} 1/V_m$) , nach denen die Maximalgeschwindigkeit V_m zu 1,59 (± o,41) mMol/lmin errechnet wurde. Das Vorliegen eines gemischten Hemmtyps mit sehr großem kompetitiven Anteil (SP im II. Quadranten nahe der Ordinate) ist nicht auszuschließen. Jedoch zeigen die Geraden der anderen drei Darstellungsarten überzeugend Kompetition an (vergl. auch Tab. 2-1). In Abb. 3-5,B schneiden sich sämtliche

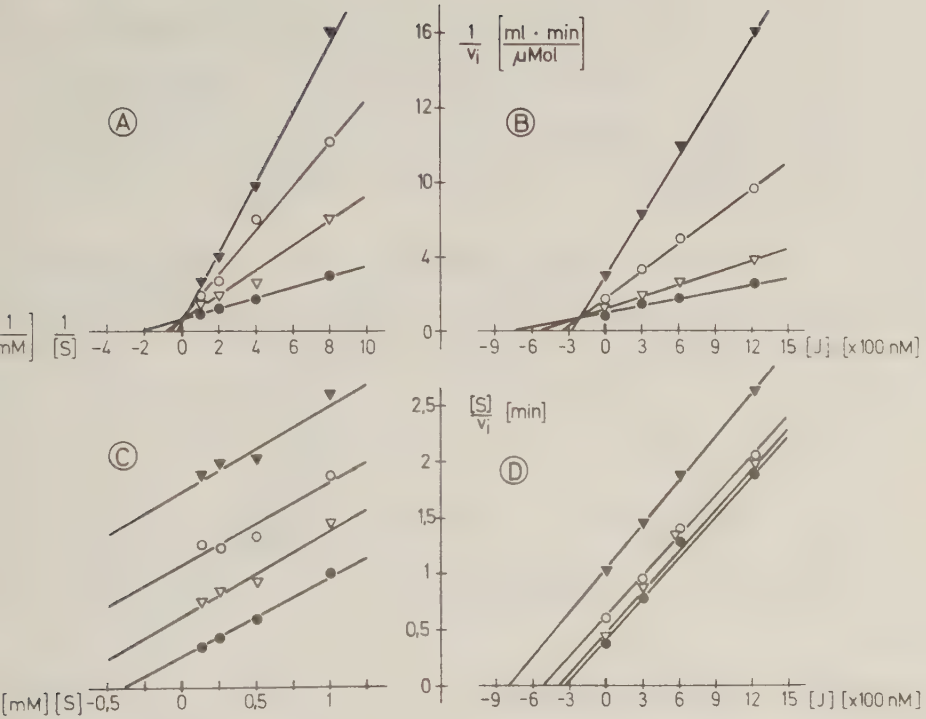


Abb. 3-5: Hemmung der AChE durch Edrophonium. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar.
A u. C: • Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 3,125 x 10^{-7} , ○ 6,25 x 10^{-7} , ▼ 1,25 x 10^{-6} M.
B u. D: Substratkonz. • 0,125 , ▽ 0,25 , ○ 0,5 , ▼ 1 mM.

Geraden in einem Punkt im II. Quadranten; der negative Abszissenabschnitt dieses Schnittpunktes ist K_i = 2,30 (± 0,10) x 10^{-7} Mol/l. Die errechneten Steigungen der Geraden weichen in der Abb. 3-5,C um maximal 6 % (0,78 (± 0,05) lmin/mMol) , in der

Abb. 3-5,D um maximal 5 % (1,21 (± o,o6) 1min/mMol) voneinander ab; damit sollte die Parallelität der Geraden als Kriterium für das Vorliegen von Kompetition ausreichend belegt sein. Der reziproke Wert der Steigungen in Abb. 3-5,C ist die Maximalgeschwindigkeit V_m , die somit zu 1,29 (± o,o8) mMol/1min bestimmt werden konnte.

Aus den Meßergebnissen ungehemmter Ansätze in A und C konnte K_m bestimmt werden: mit 4,54 x $1o^{-4}$ Mol/l (A) und 3,43 x $1o^{-4}$ Mol/l weichen die Werte deutlich voneinander ab.

Die Berechnung des K_i aus den Ordinatenabschnitten der Geraden in C ergab den Wert 2,1o (± o,12) x $1o^{-7}$ Mol/l.

Bei Wahl der Hemmstoffkonzentration zwischen 3,125 x $1o^{-7}$ und 2 x $1o^{-4}$ Mol/l konnte unter Einhaltung einer Vorinkubationsdauer von bis zu 6o min keine Hemmung der ChE erzielt werden.

3.1.4. Hemmung durch Tacrin

Bei der Inhibition der AChE durch Tacrin in Konzentrationen von 1,25 x $1o^{-8}$, 2,5 x $1o^{-8}$, 5 x $1o^{-8}$ und $1o^{-7}$ Mol/l war der Grad der Hemmung sofort nach Durchmischen des Küvetteninhalts maximal; auf eine Vorinkubation des Enzyms mit dem Inhibitor wurde daher verzichtet. AcThCh als Substrat lag bei Start der Reaktion o,25 , o,5 und o,75 mmolar vor.

In allen vier der in dieser Arbeit angewandten Darstellungsarten schneiden sich sämtliche Geraden jeweils deutlich in einem Punkt (Abb. 3-6,A-D). Dieser Schnittpunkt liegt bei A und B im II., bei C und D im III. Quadranten, was nach WEBB (1963) für das Vorliegen eines gemischten Antagonismus spricht. In einem solchen

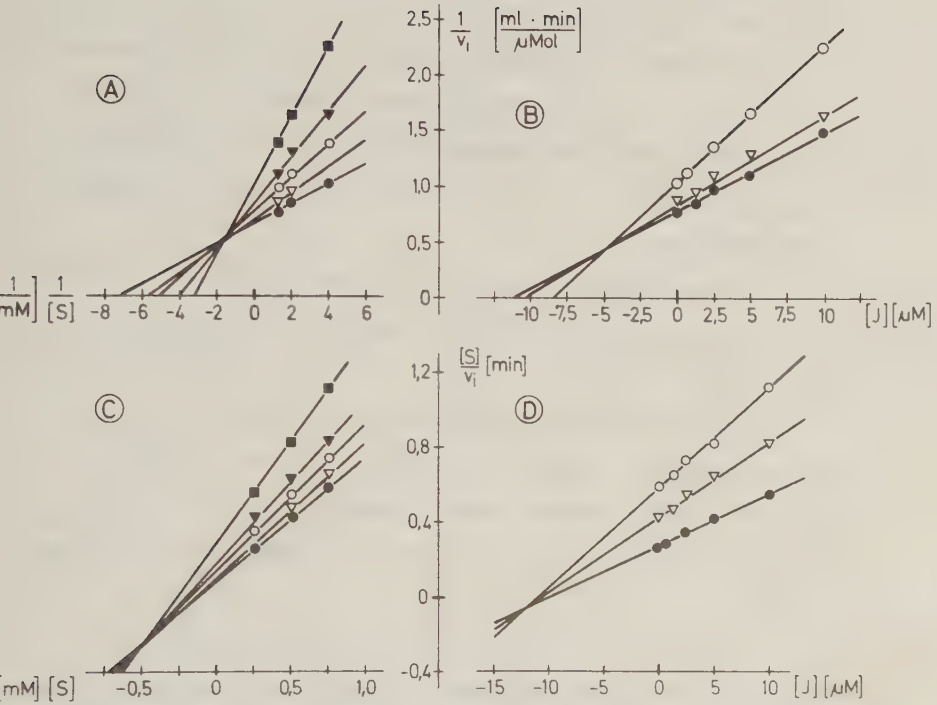


Abb. 3-6: Hemmung der AChE durch Tacrin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar.
A u. C: ● Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 1,25 x 10^{-8} , ○ 2,5 x 10^{-8} , ▼ 5 x 10^{-8} , ■ 10^{-7} M.
B u. D: Substratkonz. ● 0,25 , ▽ 0,5 , ○ 0,75 mM.

Fall gilt es, je einen K_m- und K_i-Wert für den kompetitiven und den nonkompetitiven Anteil der Hemmung zu bestimmen, die sich um einen Faktor (α) unterscheiden.

Aus den Meßergebnissen ungehemmter Ansätze konnte die

Maximalgeschwindigkeit V_m zu 1,5o mMol/1min (A) bzw. 1,49 mMol/1min (C) bestimmt werden.

Die Gerade für ungehemmte Ansätze in Abb. 3-6,A schneidet die Abszisse bei $-1/K_m$; der Abszissenabschnitt des gemeinsamen Schnittpunkts sämtlicher Geraden ist $-1/\alpha K_m$. Danach beträgt K_m 1,37 x $1o^{-4}$ Mol/l, αK_m 5,o6 ($\pm$ 1,27) x $1o^{-4}$ Mol/l. α berechnet sich daraus zu 3,7o ($\pm$ o,93).

Aus den Geraden in Abb. 3-6,C konnte K_m zu 1,51 x $1o^{-4}$ Mol/l, αK_m zu 5,5o ($\pm$ 1,43) x $1o^{-4}$ Mol/l bestimmt werden, wonach α dann 3,63 ($\pm$ o,94) beträgt.

Der Abszissenabschnitt des gemeinsamen Schnittpunkts sämtlicher Geraden in Abb. 3-6,B ist K_i , der in Abb. 3-6,D ist αK_i. Für diese beiden Hemmkonstanten konnten die Werte 4,6o ($\pm$ o,24) x $1o^{-8}$ Mol/l (K_i) und 1,29 ($\pm$ o,47) x $1o^{-7}$ Mol/l (αK_i) errechnet werden.

Die Berechnung der Hemmkonstanten aus Steigungen bzw. Ordinatenabschnitten der Geraden in Abb. 3-6,C ergab für K_i den Wert 4,o5 ($\pm$ o,25) x $1o^{-8}$ Mol/l, für αK_i den Wert 1,46 ($\pm$ o,o9) x $1o^{-7}$ Mol/l; der Faktor α ist dann 3,52 ($\pm$ o,19).

Sofort nach Durchmischen von ChE und Inhibitor (6,25 x $1o^{-8}$, 1,25 x $1o^{-7}$ und 2,5 x $1o^{-7}$ Mol/l) wurde die Reaktion durch Zugabe von BuThCh als Substrat (1,5 , 3 und 6 mMol/l) gestartet. Wie bei der AChE-Hemmung durch Tacrin konnte auch hier der Grad der Hemmung durch Verlängerung der Vorinkubationsdauer nicht erhöht werden.

Die graphische Analyse der Meßergebnisse zeigt, daß es sich im vorliegenden Fall wieder um einen gemischten (d.h. zusammen-

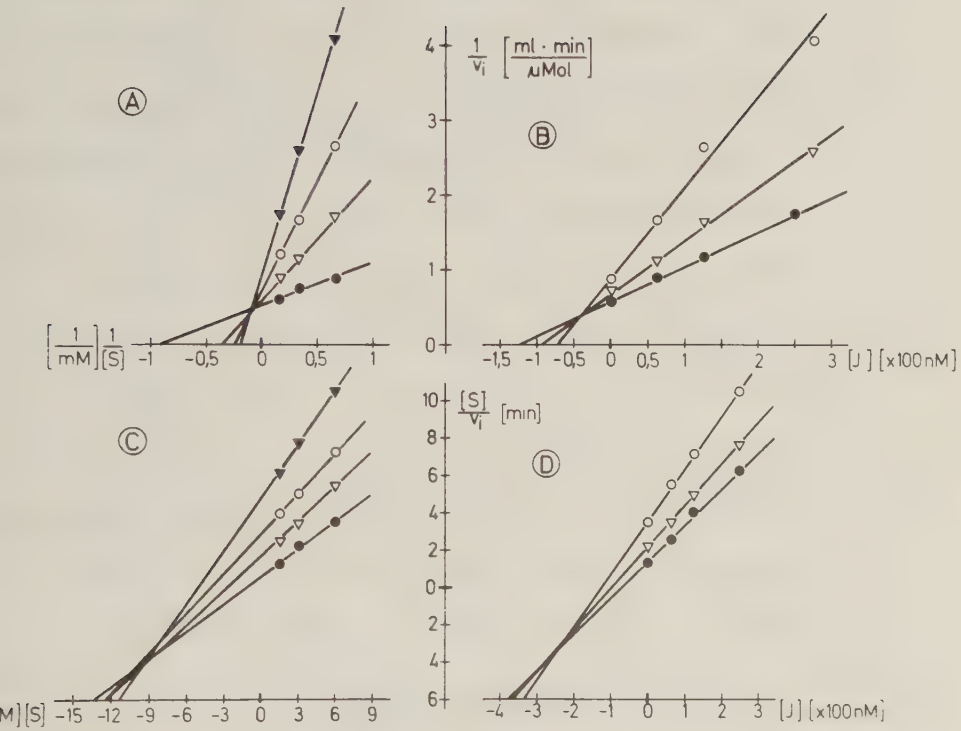


Abb. 3-7: Hemmung der ChE durch Tacrin. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar.
A u. C: • Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz. ▽ 6,25 x 10^{-8} , ○ 1,25 x 10^{-7} , ▼ 2,5 x 10^{-7} M.
B u. D: Substratkonz. • 1,5 , ▽ 3, ○ 6 mM.

gesetzten) Hemmtyp handelt: sämtliche Geraden der Abb. 3-7,A u. B haben ihren gemeinsamen Schnittpunkt im II., sämtliche Geraden der Abb. 3-7,C u. D haben ihren gemeinsamen Schnittpunkt im III. Quadranten.

Die Maximalgeschwindigkeit V_m beträgt 1,92 mMol/lmin (A) bzw. 2,05 mMol/lmin (C). Nach den in Abb. 3-7,A dargestellten Meßergebnissen beträgt K_m 1,06 x 10^{-3} Mol/l, αK_m 9,03 (± 2,96) x 10^{-3} Mol/l, α somit 8,57 (± 2,79). Mit etwas geringeren Streuungen konnten diese Konstanten aus den in Abb. 3-7,C dargestellten Daten bestimmt werden, und zwar K_m zu 1,33 x 10^{-3} Mol/l, αK_m zu 9,33 (± 0,94) x 10^{-3} Mol/l, α zu 7,02 (± 0,71).

Die Abszissenabschnitte des gemeinsamen Schnittpunktes sämtlicher Geraden in den Darstellungen B und D lieferten die Werte für K_i und αK_i, und zwar 3,53 (± 0,01) x 10^{-8} Mol/l (B) für K_i und 3,06 (± 0,02) x 10^{-7} Mol/l (D) für αK_i. Etwas größere Streuungen zeigten die aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der in Abb. 3-7,C dargestellten Geraden berechneten Werte für die Hemmkonstanten: danach beträgt K_i 3,91 (± 0,32) x 10^{-8} Mol/l, αK_i 2,63 (± 0,08) x 10^{-7} Mol/l, α somit 7,06 (± 0,43).

3.1.5. Hemmung durch Paraoxon (E 600)

ChE wurde mit Paraoxon in den Konzentrationen 5 x 10^{-7}, 2,5 x 10^{-7} und 1,25 x 10^{-7} Mol/l eine bis zweiunddreißig Minuten lang vorinkubiert, die Reaktion dann durch Zugabe von BuThCh als Substrat (Startkonzentration 4 Mol/l) gestartet.

Die Darstellung der Meßergebnisse erfolgte im halblogarithmischen Raster, wobei die prozentuale Restaktivität des Enzyms gegen die Dauer der Vorinkubation aufgetragen wurde (Abb. 3-8). Solange ein sogenannter irreversibler Inhibitor in bezug auf die Enzym-Konzentration im Überschuß vorhanden ist, kann innerhalb endlicher Inkubationsdauer vollständige Hemmung (0 % Restaktivität)

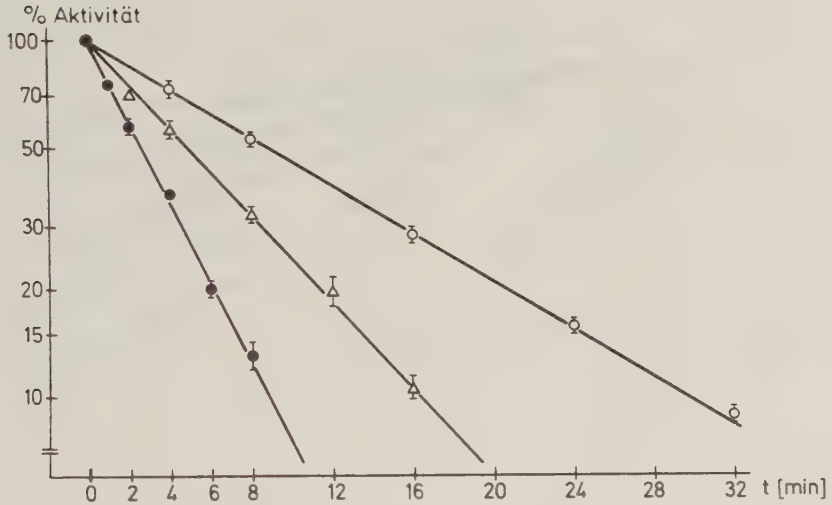


Abb. 3-8: Hemmung der ChE durch Paraoxon. Auftragung der prozentualen Restaktivität des Enzyms gegen die Dauer der Vorinkubation im halblogarithmischen Raster. Jeder Punkt ist das Mittel von je drei Messungen. Der Verlauf der Geraden wurde mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms ermittelt. - Substratkonzentration 4 mM. Hemmstoffkonz. o 1,25 x 10^{-7} , Δ 2,5 x 10^{-7} , • 5 x 10^{-7} M.

erzielt werden. Die aus den in Abb. 3-8 dargestellten Meßergebnissen errechneten Halbwertszeiten der Aktivität betragen 2,6 , 4,9 und 8,9 min bei Inhibitorkonzentrationen von 5, 2,5 und 1,25 x 10^{-7} Mol/l, verhalten sich also umgekehrt proportional zu den Inhibitorkonzentrationen (s. ALDRIDGE, 1950). Die Geschwindigkeitskonstante $k = 1/t_{0,5}[I]$ konnte zu 8,3 ($\pm$ 0,5) x 10^{5} l/Molmin berechnet werden.

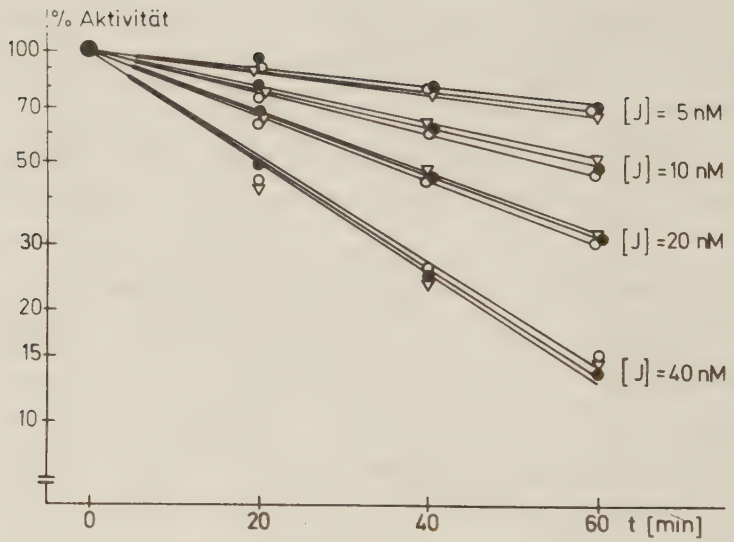


Abb. 3-9: Hemmung der ChE durch Paraoxon. Logarithmus der Restaktivität des Enzyms aufgetragen gegen die Dauer der Vorinkubation. - Substratkonz. o 1,5 , ▽ 3, • 6 mM.

In einem weiteren Versuch wurde die Inhibitorkonzentration auf 4×10^{-8} , 2×10^{-8} , 10^{-8} und schließlich 5×10^{-9} Mol/l herabgesetzt; die Dauer der Vorinkubation betrug 20, 40 und 60 Minuten; bei Start der Reaktion lag das Substrat (BuThCh) 1,5 , 3 und 6 mmolar vor.

In Abb. 3-9 ist die prozentuale Restaktivität des Enzyms im halblogarithmischen Raster gegen die Dauer der Vorinkubation dargestellt: die Halbwertszeiten erweisen sich als unabhängig von der Substratkonzentration.

Die nach 60-minütiger Vorinkubationsdauer gemessenen Enzym-

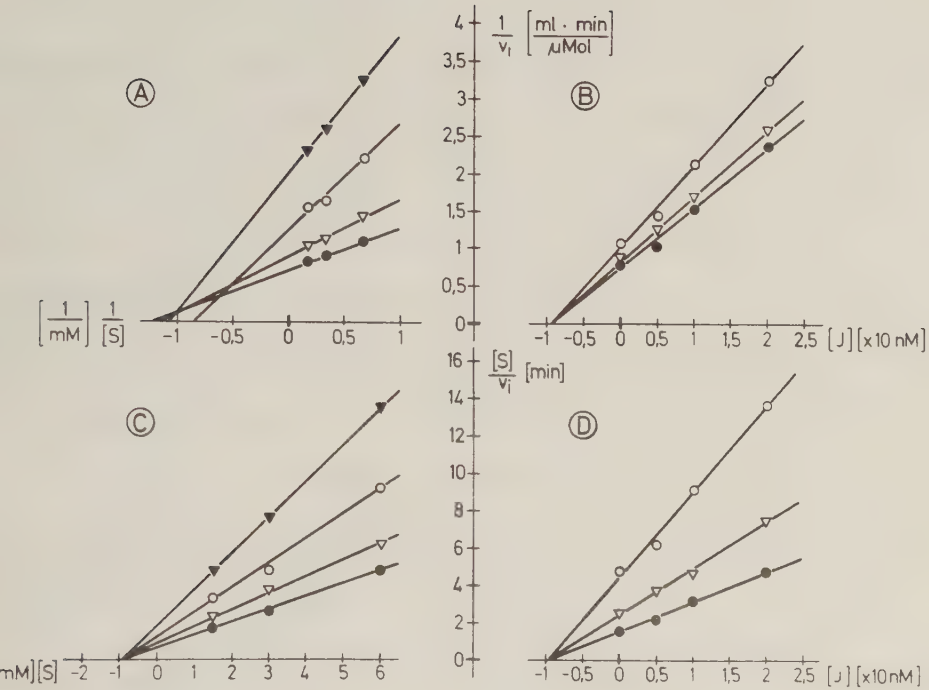


Abb. 3-1o: Hemmung der ChE durch Paraoxon. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Vorinkub. 1 h.
A u. C: ● Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz.
▽ 5 x 10^{-9} , ○ 10^{-8} , ▼ 2 x 10^{-8} M.
B u. D: Substratkonz. ● 1,5 , ▽ 3, ○ 6 mM.

aktivitäten sind ferner wie die Meßergebnisse der Hemmversuche mit reversiblen Inhibitoren augewertet worden (s. Abb. 3-1o), wobei allerdings auf die Darstellung der Ergebnisse stark gehemmter Ansätze ([I] = 4 x 10^{-8} M) verzichtet wurde.

Die Darstellung nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 3-1o,A) kann

nicht zur Bestimmung eines möglichen Hemmtyps dienen: die Schnittpunkte liegen weit gestreut im II. und III. Quadranten. Alle anderen Kurvenscharen in Abb. 3-1o weisen jedoch auf das Vorliegen von Nonkompetition hin: sämtliche Geraden schneiden sich jeweils in einem Punkt auf der Abszisse. Die Bestimmung der verschiedenen Konstanten erfolgte wie schon in Kap. 3.1.1. und 3.1.2. beschrieben. Danach beträgt die Maximalgeschwindigkeit V_m 1,43 mMol/lmin (A) bzw. 1,41 mMol/lmin (C). Der Wert für die MICHAELIS-Konstante K_m streut nach der Berechnung aus den in Abb. 3-1o,A dargestellten Daten mit 9,95 ($\pm$ 2,21) x $1o^{-4}$ Mol/l fast doppelt so stark wie der aus den C-Daten zu 9,46 ($\pm$ 1,26) x $1o^{-4}$ Mol/l berechnete.

Aus den Schnittpunkten der Geraden in Abb. 3-1o,B u. D konnte der Wert für die Hemmkonstante $K_{i6o'}$ zu 8,97 ($\pm$ o,43) x $1o^{-9}$ Mol/l (B) bzw. 9,53 ($\pm$ o,4o) x $1o^{-9}$ Mol/l (D) bestimmt werden. Die Berechnung des $K_{i6o'}$ aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in Abb. 3-1o,C ergab die Werte 11,34 ($\pm$ o,48) x $1o^{-9}$ Mol/l und 7,31 ($\pm$ 1,o1) x $1o^{-9}$ Mol/l.

Wie oben beschrieben, war nach nur 4o-minütiger Vorinkubationsdauer der Grad der Enzymhemmung deutlich geringer (vergl. Abb. 3-9). Für die Hemm-'Konstante' $K_{i4o'}$ sollten also höhere Werte berechnet werden können. Die Auswertung der Meßergebnisse ergab für $K_{i4o'}$: 1,59 ($\pm$ o,27) x $1o^{-8}$ Mol/l (B), 1,62 ($\pm$ o,31) x $1o^{-8}$ Mol/l (D), 1,57 ($\pm$ o,39) x $1o^{-8}$ Mol/l (Berechnung aus C).

AChE wurde mit Paraoxon 6o Minuten lang vorinkubiert; der Inhibitor lag dabei 5 x $1o^{-9}$, $1o^{-8}$, 2 x $1o^{-8}$, 4 x $1o^{-8}$ und 8 x $1o^{-8}$ molar vor. Bei Start der Reaktion betrug die Substratkonzentration (AcThCh) o,25 , o,5 und o,75 mMol/l.

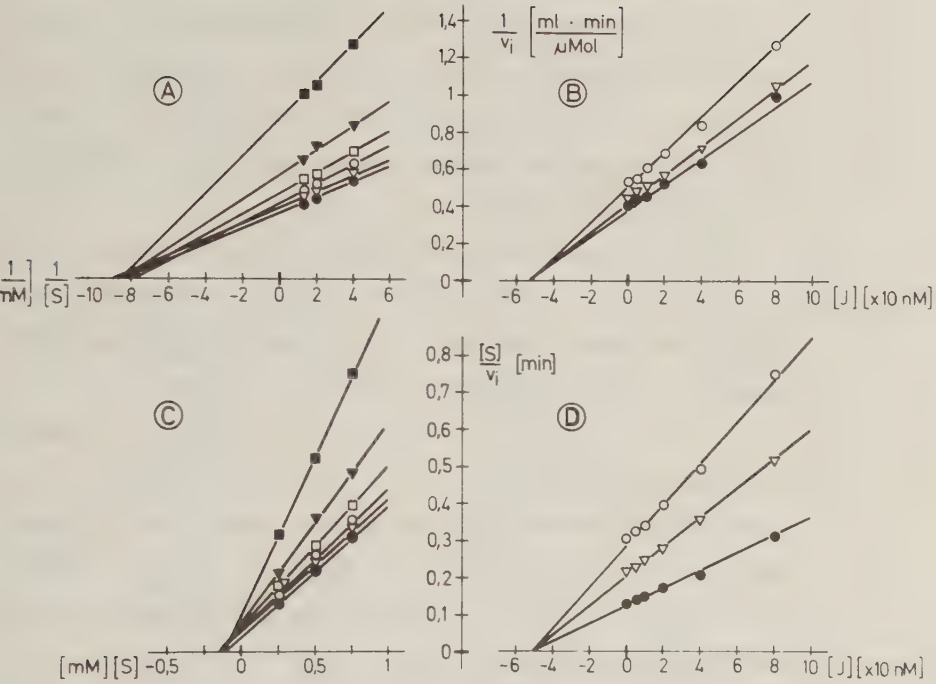


Abb. 3-11: Hemmung der AChE durch Paraoxon. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Vorinkub. 1 h.
A u. C: ● Ansätze ohne Hemmstoff; Hemmstoffkonz.
▽ 5×10^{-9} , ○ 10^{-8} , □ 2×10^{-8} ,
▼ 4×10^{-8} , ■ 8×10^{-8} M.
B.u. D: Substratkonz. ● 0,25 , ▽ 0,5 , ○ 1,0 mM.

Während der Verlauf der Geraden in der Darstellung nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 3-11,A) wieder keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Hemmtyp erlaubt, zeigen die Geraden der anderen Darstellungsarten sicher Nonkompetition an: sämtliche Geraden

schneiden sich jeweils in einem Punkt auf der Abszisse.

V_m ist 2,84 mMol/lmin (A) bzw. 2,95 mMol/lmin (C). Aus den Schnittpunkten sämtlicher Geraden in A und C errechnete sich K_m zu 1,33 ($\pm$ o,74) x $1o^{-4}$ Mol/l (A) und 1,42 ($\pm$ o,2o) x $1o^{-4}$ Mol/l (C); wobei der aus den A-Daten bestimmte Wert für K_m wieder eine sehr große Streuung zeigt.

Aus den Schnittpunkten der Geraden in B und D konnte $K_{i6o'}$ zu 5,2o ($\pm$ o,59) x $1o^{-8}$ Mol/l (B) und 5,o1 ($\pm$ o,19) x $1o^{-8}$ Mol/l (D) bestimmt werden. Die Berechnung dieser Konstanten aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in C lieferte die Werte 6,72 ($\pm$ 1,o8) x $1o^{-8}$ Mol/l und 5,19 ($\pm$ 1,72) x $1o^{-8}$ Mol/l. Es sei noch einmal erwähnt, daß sich bei Enzym-Hemmung mit sogenannten irreversiblen Inhibitoren die Hemmkonstante K_i umgekehrt proportional zur Dauer der Vorinkubation verhält. Vergleichbar sind also nur K_i-Werte von Hemmversuchen, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

3.2. Aktivitätsmessung und Auswertung bei Substrat-"Mangel"

3.2.1. Hemmung durch Pyridostigmin (Mestinon^R)

AChE wurde mit Pyridostigmin in den Konzentrationen 3,125 x $1o^{-7}$, 6,25 x $1o^{-7}$, 1,25 x $1o^{-6}$ und 2,5 x $1o^{-6}$ Mol/l 2 1/2 Stunden lang vorinkubiert; dann wurde die Reaktion durch Zugabe von AcThCh als Substrat gestartet. Die Substratkonzentrationen wurden dabei zu 2 x $1o^{-5}$, $1o^{-5}$ und 5 x $1o^{-6}$ Mol/l gewählt.

Die errechneten k-Werte, die - wie im Kap. 2.2.2. beschrieben ein Geschwindigkeitsmaß für die Hydrolysierung des Substrats

Pyridostigmin	ø	$3{,}125 \times 10^{-7}$	$6{,}25 \times 10^{-7}$	$1{,}25 \times 10^{-6}$	$2{,}5 \times 10^{-6}$	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
AcThCh							
2×10^{-5}	645 ± 45	513 ± 1	380 ± 10	256 ± 4	160 ± 3	0,9903	$8{,}995 \times 10^{-7}$
10^{-5}	660 ± 28	513 ± 12	394 ± 16	245 ± 6	172 ± 30	0,9867	$9{,}037 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	671 ± 20	521 ± 17	401 ± 14	264 ± 8	163 ± 8	0,9932	$8{,}995 \times 10^{-7}$
	664 ± 23	515 ± 10	390 ± 15	256 ± 10	165 ± 16		$9{,}009 \times 10^{-7}$

Tab. 3-1: Hemmung der AChE durch Pyridostigmin. Vorinkubation 2 1/2 h.
In der obersten Zeile sind die Hemmstoffkonzentrationen angegeben; in der 1. Spalte finden sich die Angaben zur Substratkonzentration (alle Konzentrationsangaben in M). - Die k-Werte ungehemmter Ansätze stehen in der 2. Spalte, die k-Werte gehemmter Ansätze in der 3. bis 6. (Dimension von k: min^{-1} ; die angegebenen Werte sind mit 10^{-3} zu multiplizieren). In der untersten Zeile findet sich jeweils der Mittelwert sämtlicher k-Werte der entsprechenden Spalte. - In der vorletzten Spalte ist der Korrelationskoeffizient der Regression prozentualer k-Abnahme auf den Logarithmus der Inhibitorkonzentration angegeben. In der letzten Spalte findet sich für jede Regressionsgerade derjenige Abszissenabschnitt (= Inhibitorkonzentration in M), dem eine Halbierung des k ungehemmter Ansätze entspricht. Das Mittel der drei Werte ist in der untersten Zeile angegeben.

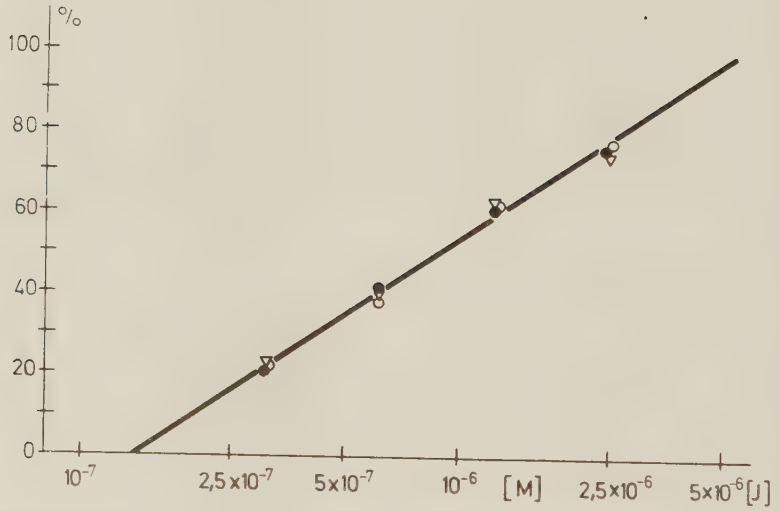


Abb. 3-12: Hemmung der AChE durch Pyridostigmin. Prozentuale Abnahme des k-Wertes aufgetragen gegen den Logarithmus der Hemmstoffkonzentration. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. Der Verlauf der Geraden ist mit Hilfe eines Regressionsgeradenprogramms ermittelt worden. - Substratkonz. ● 2×10^{-5}, ▽ 10^{-5}, ○ 5×10^{-6} M. - Vorinkubation 2 1/2 h.

darstellen, sind in der Tab. 3-1 aufgeführt. Die Hydrolysierungsgeschwindigkeit des Substrats (bzw. seine Halbwertszeit) erweist sich dabei als unabhängig von der vorgegebenen Substratkonzentration, wenn diese unter ca. 10^{-4} molar liegt (vergl. Tab. 3-1); k ist natürlich abhängig vom Grad der Enzym-Hemmung.

In Abb. 3-12 ist die prozentuale Abnahme des k-Wertes gegen die Inhibitorkonzentration im halblogarithmischen Raster dargestellt worden (vergl. DROSS, 1977). Nach dem Verlauf der Geraden

ist bei einer Inhibitorkonzentration $< 1o^{-7}$ Mol/l keine Hemmung zu erwarten ($k_{geh.} = k_{ungeh.}$) , oberhalb einer Inhibitorkonzentration von $7 \times 1o^{-6}$ Mol/l dürfte der Grad der Hemmung vollständig sein ($k_{geh.} \rightarrow 0$).

Eine Abnahme des k-Wertes um 5o % erfolgt bei einer Inhibitorkonzentration von 9,o1 ($\pm$ o,o2) $\times 1o^{-7}$ Mol/l (s. Abb. 3-12 und Tab. 3-1). Die geringe Standardabweichung verdeutlicht, wie eng die den verschiedenen Substratkonzentrationen entsprechenden Geraden aufeinanderprojeziert werden, d.h. die Hemmung ist in diesem Bereich ($< 1o^{-4}$ molar) unabhängig von der Substratkonzentration. Die ermittelte [I]-Konzentrationsangabe, bei der Halbierung des k-Wertes erzielt wird, liegt nah an dem mit Hilfe des klassischen Verfahrens gefundenen K_i von 1o,5 , 1o,9 bzw. $12,2 \times 1o^{-7}$ Mol/l (vergl. Kap. 3.1.1.).

ChE wurde 2 1/2 Stunden lang mit Pyridostigmin in den Konzentrationen $3,125 \times 1o^{-7}$, $6,25 \times 1o^{-7}$, $1,25 \times 1o^{-6}$ und $2,5 \times 1o^{-6}$ Mol/l vorinkubiert. Bei Start der Reaktion betrug die Substratkonzentration $2 \times 1o^{-5}$, $1o^{-5}$ und $5 \times 1o^{-6}$ Mol/l.

Tab. 3-2 zeigt die errechneten k-Werte, die nur von der Hemmstoff- , nicht aber von der Substratkonzentration abhängen. Die Darstellung der prozentualen Abnahme der k-Werte im halblogarithmischen Raster gegen die Inhibitorkonzentration (hier nicht abgebildet) ergab folgendes: deutliches Aufeinanderprojezieren der den drei Substratkonzentrationen entsprechenden Geraden; keine Hemmung bei $[I] < 7 \times 1o^{-8}$ molar; vollständige Hemmung des Enzyms bei $[I] > 1o^{-5}$ molar; Halbierung des $k_{ungeh.}$ bei [I] = 9,o9 ($\pm$ o,14) $\times 1o^{-7}$ Mol/l (s. Tab. 3-2). Diese Kon-

Pyrido-stigmin	ø	3,125 x 10^{-7}	6,25 x 10^{-7}	1,25 x 10^{-6}	2,5 x 10^{-6}	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
BuThCh							
2 x 10^{-5}	929 ± 35	667 ± 13	539 ± 4	426 ± 2	255 ± 18	0,9875	8,955 x 10^{-7}
10^{-5}	970 ± 34	666 ± 25	567 ± 12	436 ± 10	296 ± 17	0,9926	9,226 x 10^{-7}
5 x 10^{-5}	968 ± 54	676 ± 23	554 ± 11	430 ± 8	291 ± 2	0,9969	9,079 x 10^{-7}
	955 ± 45	669 ± 17	554 ± 15	431 ± 8	283 ± 23		9,087 x 10^{-7}

Tab. 3-2: Hemmung der ChE durch Pyridostigmin. Vorinkubation 2 1/2 h. - Legende s. Tab. 3-1.

Neo-stigmin	ø	7,813 x 10^{-9}	1,563 x 10^{-8}	3,125 x 10^{-8}	6,25 x 10^{-8}	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
AcThCh							
2 x 10^{-5}	445 ± 9	342 ± 14	244 ± 8	183 ± 16	130 ± 6	0,9864	2,000 x 10^{-8}
10^{-5}	449 ± 31	340 ± 10	250 ± 18	172 ± 11	126 ± 18	0,9882	2,109 x 10^{-8}
5 x 10^{-6}	476 ± 19	338 ± 22	273 ± 29	180 ± 5	130 ± 6	0,9849	2,094 x 10^{-8}
	456 ± 26	340 ± 13	256 ± 22	178 ± 11	129 ± 10		2,068 x 10^{-8}

Tab. 3-3: Hemmung der AChE durch Neostigmin. Vorinkubation 2 1/2 h. - Legende s. Tab. 3-1.

zentrationsangabe stimmt mit dem in Kap. 3.1.1. beschriebenen Wert für K_i (8,6 , 8,9 und 9,3 x 10^{-7} Mol/l) gut überein.

3.2.2. Hemmung durch Neostigmin (Prostigmin^R)

Wie bei der klassischen Aktivitätsmessung im Bereich der Substrat-Sättigung wurde auch bei Versuchsdurchführung im Bereich des Substrat-"Mangels" eine 2 1/2 - stündige Vorinkubationszeit eingehalten. Neostigmin als Inhibitor der AChE lag dabei in den Konzentrationen 7,813 x 10^{-9} , 1,563 x 10^{-8} , 3,125 x 10^{-8} und 6,25 x 10^{-8} Mol/l vor. Bei Start der Reaktion betrug die AcThCh-Konzentration 2 x 10^{-5} , 10^{-5} und 5 x 10^{-6} Mol/l.

In der Tab. 3-3 sind die aus den Meßergebnissen errechneten k-Werte zusammengestellt. Innerhalb der einzelnen Spalten, also jeweils bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration, stimmen sie bei unterschiedlich gewählter Substratkonzentration gut miteinander überein. Wird die prozentuale Abnahme des k gegen [I] aufgetragen (hier nicht abgebildet) , kann anhand des Verlaufs der aufeinanderliegenden Geraden gesagt werden: bei Wahl der Inhibitorkonzentration zwischen 1,5 x 10^{-10} und 2,5 x 10^{-7} Mol/l darf 0 bis 100 %ige Hemmung der AChE erwartet werden. Eine Halbierung des $k_{ungeh.}$ erfolgt bei [I] = 2,07 ($\pm$ 0,06) x 10^{-8} Mol/l. Man vergleiche diesen Wert mit dem für K_i aus Kap. 3.1.2. (2,2 x 10^{-8} Mol/l).

ChE wurde ebenfalls 2 1/2 Stunden lang mit Neostigmin in den Konzentrationen 2,5 x 10^{-8} , 5 x 10^{-8} , 10^{-7} und 2 x 10^{-7} Mol/l vorinkubiert. BuThCh diente 10^{-5} , 5 x 10^{-6} und 2,5 x 10^{-6} molar als Substrat.

Die errechneten k-Werte finden sich in der Tab. 3-4 dargestellt. Wie bei den vorher beschriebenen Ergebnissen zeigt sich auch hier innerhalb der Spalten eine gute Übereinstimmung der k-Werte. Die graphische Analyse (hier nicht abgebildet) ergab: eine 0 bis 100 %ige Enzym-Hemmung kann bei Wahl der Inhibitorkonzentration zwischen 5×10^{-9} und 5×10^{-7} molar erzielt werden. Bei $[I] = 5{,}59 (\pm 0{,}14) \times 10^{-8}$ molar wird $k_{ungeh.}$ halbiert. Dieser Wert stimmt gut mit dem in Kap. 3.1.2. für K_i gefundenen überein (5,0 , 5,1 , 5,6 und $6{,}3 \times 10^{-8}$ Mol/l).

3.2.3. Hemmung durch Edrophonium (Tensilon^R)

Ohne Vorinkubation (vergl. Kap. 3.1.3.) wurde die Reaktion sofort nach Durchmischen von AChE und Inhibitor ($1{,}563 \times 10^{-7}$, $3{,}125 \times 10^{-7}$, $6{,}25 \times 10^{-7}$ und $1{,}25 \times 10^{-6}$ molar) durch Zugabe von AcThCh als Substrat (2×10^{-5} , 10^{-5} und 5×10^{-6} molar) gestartet. In der Tab. 3-5 sind die aus den Meßergebnissen errechneten k-Werte aufgelistet, in der Abb. 3-13 ist die prozentuale Abnahme des k im halblogarithmischen Raster gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen worden. Wie bei der Inhibition durch Carbaminsäureester zeigen die k-Werte auch bei Hemmung durch Edrophonium eine Abhängigkeit nur von [I], nicht aber von [S]: die den drei verschiedenen Substratkonzentrationen entsprechenden Geraden in Abb. 3-13 liegen aufeinander. Bei der hier angewandten Methode treten die in Kap. 3.1. gefundenen Hinweise auf das Zugrundeliegen unterschiedlicher Hemm-Mechanismen nicht zutage. Nach Abb. 3-13 erfolgt bei $[I] \ll 10^{-8}$ molar keine, bei $[I] > 3 \times 10^{-6}$ molar vollständige Hemmung; bei $[I] = 1{,}54 (\pm 0{,}03)$

Neostigmin	ø	$2{,}5 \times 10^{-8}$	5×10^{-8}	10^{-7}	2×10^{-7}	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
BuThCh 10^{-5}	934 ± 19	649 ± 33	495 ± 12	333 ± 14	166 ± 5	o,9977	$5{,}433 \times 10^{-8}$
5×10^{-6}	977 ± 71	678 ± 7	511 ± 17	367 ± 3o	193 ± 3	o,9976	$5{,}715 \times 10^{-8}$
$2{,}5 \times 10^{-6}$	947 ± 62	641 ± 6	5o5 ± 13	335 ± 17	178 ± 5	o,9985	$5{,}611 \times 10^{-8}$
	949 ± 63	653 ± 3o	5o3 ± 13	343 ± 23	177 ± 12		$5{,}586 \times 10^{-8}$

Tab. 3-4: Hemmung der ChE durch Neostigmin. Vorinkubation 2 1/2 h. - Legende s. Tab. 3-1.

Edrophonium	ø	$1{,}563 \times 10^{-7}$	$3{,}125 \times 10^{-7}$	$6{,}25 \times 10^{-7}$	$1{,}25 \times 10^{-6}$	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
AcThCh 2×10^{-5}	613 ± 15	3o7 ± 1	233 ± 2	136 ± 4	9o ± 5	o,993o	$1{,}553 \times 10^{-7}$
10^{-5}	658 ± 17	328 ± 1	253 ± 13	159 ± 38	96 ± 1o	o,9928	$1{,}564 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	651 ± 15	328 ± 1o	24o ± 8	166 ± 4	93 ± 6	o,9965	$1{,}515 \times 10^{-7}$
	643 ± 25	321 ± 11	242 ± 12	154 ± 26	93 ± 8		$1{,}544 \times 10^{-7}$

Tab. 3-5: Hemmung der AChE durch Edrophonium. - Legende siehe Tab. 3-1.

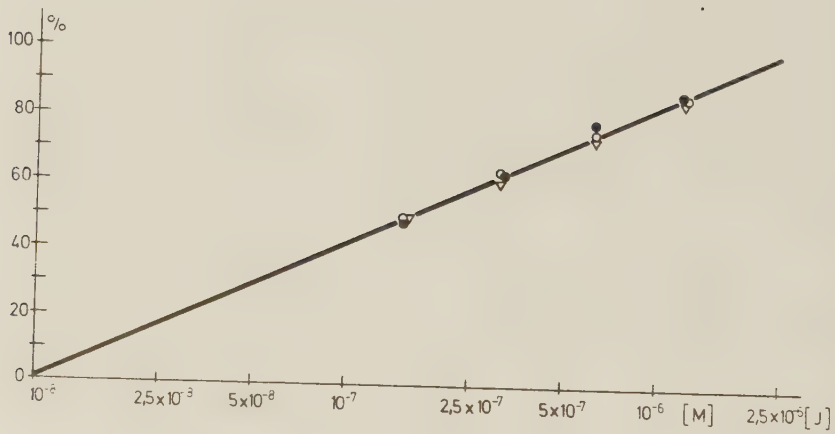


Abb. 3-13: Hemmung der AChE durch Edrophonium. Prozentuale Abnahme des k-Wertes aufgetragen gegen den Logarithmus der Hemmstoffkonzentration. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. - Substratkonz. ● 2 x $1o^{-5}$, ▽ $1o^{-5}$, ○ 5 x $1o^{-6}$ M.

x $1o^{-7}$ Mol/l wird $k_{ungeh.}$ halbiert. Dieser letztgenannte Wert ist ca. 3o % kleiner als die beiden in Kap. 3.1.3. für K_i beschriebenen (2,1 und 2,3 x $1o^{-7}$ Mol/l).

3.2.4. Hemmung durch Tacrin

Sofort nach Durchmischen von Enzymlösung (AChE) und Hemmstoff in den Konzentrationen 6,25 x $1o^{-9}$, 1,25 x $1o^{-8}$, 2,5 x $1o^{-8}$, 5 x $1o^{-8}$ und $1o^{-7}$ Mol/l wurde die Reaktion durch Zugabe von AcThCh als Substrat (2 x $1o^{-5}$, $1o^{-5}$ und 5 x $1o^{-6}$ molar) gestartet (vergl. auch Kap. 3.1.4.).

Tacrin	Ø	6,25 x 10^{-9}	1,25 x 10^{-8}	2,5 x 10^{-8}	5 x 10^{-8}	10^{-7}	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
AcThCh								
2 x 10^{-5}	496 ± 29	386 ± 6	308 ± 4	-	211 ± 4	133 ± 9	0,9946	2,911 x 10^{-8}
10^{-5}	498 ± 22	381 ± 8	326 ± 2	270 ± 4	206 ± 9	134 ± 7	0,9966	2,938 x 10^{-8}
5 x 10^{-6}	501 ± 17	386 ± 1	321 ± 6	264 ± 3	207 ± 4	135 ± 8	0,9983	2,865 x 10^{-8}
	498 ± 22	384 ± 5	317 ± 9	266 ± 5	208 ± 6	134 ± 7		2,905 x 10^{-8}

Tab. 3-6: Hemmung der AChE durch Tacrin. - Legende siehe Tab. 3-1.

Tacrin	Ø	6,25 x 10^{-9}	1,25 x 10^{-8}	2,5 x 10^{-8}	5 x 10^{-8}	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
BuThCh							
10^{-5}	744 ± 25	496 ± 19	423 ± 11	312 ± 6	204 ± 14	0,9840	1,694 x 10^{-8}
5 x 10^{-6}	750 ± 8	522 ± 6	423 ± 14	310 ± 6	211 ± 4	0,9976	1,649 x 10^{-8}
2,5 x 10^{-6}	752 ± 22	527 ± 9	416 ± 3	323 ± 10	214 ± 7	0,9979	1,702 x 10^{-8}
	749 ± 18	518 ± 17	422 ± 10	315 ± 9	210 ± 8		1,682 x 10^{-8}

Tab. 3-7: Hemmung der ChE durch Tacrin. - Legende siehe Tab. 3-1.

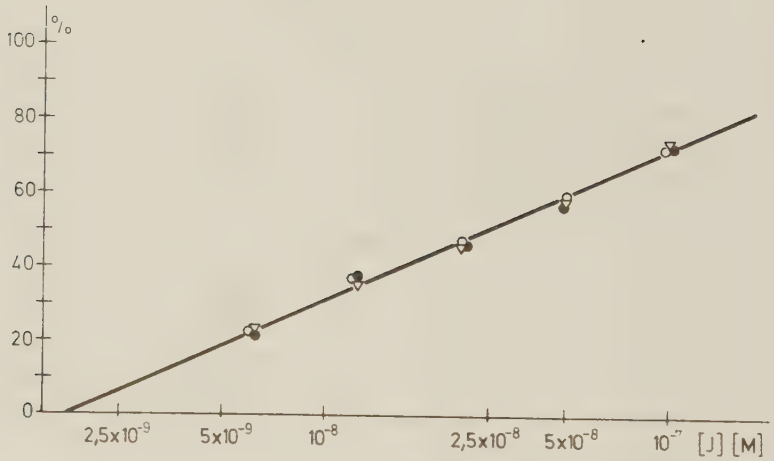


Abb. 3-14: Hemmung der AChE durch Tacrin. Prozentuale Abnahme des k-Wertes aufgetragen gegen den Logarithmus der Hemmstoffkonzentration. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. - Substratkonzentration ● 2 x 10^{-5} , ▽ 10^{-5} , ○ 5 x 10^{-6} M.

Auch bei Esterase-Hemmung durch Tacrin - nach den Ergebnissen des Kap. 3.1.4. soll es sich um einen gemischten Hemmtyp handeln - zeigen die in Tab. 3-6 dargestellten k-Werte Abhängigkeit von der Inhibitor- , nicht aber von der Substratkonzentration. Wird die prozentuale Abnahme des k halblogarithmisch gegen [I] aufgetragen, so projezieren sich die den verschiedenen Substratkonzentrationen entsprechenden Geraden aufeinander (Abb. 3-14). Nach der Graphik ist 0 bis 100 %ige Hemmung der AChE zwischen [I] = 1,5 x 10^{-9} Mol/l und [I] = 5 x 10^{-7} Mol/l zu erwarten. Eine Abnahme des k-Wertes um 50 % erfolgt bei [I] = 2,91 ($\pm$ 0,04)

x 10^{-8} Mol/l. Dieser Wert liegt unter dem kleineren der in Kap. 3.1.4. für die Hemmkonstanten K_i (4,1 und 4,6 x 10^{-8} Mol/l) und αK_i (12,9 und 14,6 x 10^{-8} Mol/l) gefundenen Werte.

Die Aktivitätsmessung der ChE erfolgte ebenfalls ohne vorangegangener Vorinkubation mit dem Inhibitor (Konzentrationen 6,25 x 10^{-9} , 1,25 x 10^{-8} , 2,5 x 10^{-8} und 5 x 10^{-8} molar). BuThCh als Substrat lag bei Start der Reaktion 10^{-5} , 5 x 10^{-6} und 2,5 x 10^{-6} molar vor.

Innerhalb der einzelnen Spalten der Tab. 3-7 stimmen die errechneten k-Werte gut miteinander überein. Die Auswertung ergab, daß bei $[I] < 10^{-9}$ Mol/l keine, bei $[I] > 2 \times 10^{-7}$ Mol/l vollständige ChE-Hemmung erwartet werden kann. Eine molare Inhibitorkonzentration von 1,68 ($\pm$ 0,03) x 10^{-8} bewirkt Halbierung des k-Wertes. Dieser Wert ist kleiner als der kleinere der beiden in Kap. 3.1.4. genannten Werte für die Hemmkonstanten K_i (3,5 und 3,9 x 10^{-8} Mol/l) und αK_i (2,6 und 3,1 x 10^{-7} Mol/l).

3.2.5. Hemmung durch Paraoxon (E 600)

Da der Wert für diejenige Hemmstoffkonzentration, durch die eine Halbierung des k erzielt werden kann, mit dem in Kap. 3.1.5. beschriebenen Wert für K_{i60}, verglichen werden sollte, wurde auch hier eine Vorinkubationsdauer von 60 min eingehalten. Paraoxon lag dabei 2,5 x 10^{-9} , 5 x 10^{-9} , 10^{-8} , 2 x 10^{-8} und 4 x 10^{-8} molar vor; die Startkonzentration von BuThCh als Substrat der ChE betrug 10^{-5} , 5 x 10^{-6} und 2,5 x 10^{-6} Mol/l.

Die aus den Meßergebnissen errechneten k-Werte finden sich in Tab. 3-8. Wie bei den vorhergehend beschriebenen Hemmversuchen

Paraoxon	Ø	$1o^{-8}$	$2 \times 1o^{-8}$	$4 \times 1o^{-8}$	$8 \times 1o^{-8}$	$1,6 \times 1o^{-7}$	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
AcThCh								
$2 \times 1o^{-5}$	491 ± 2o	422 ± 17	361 ± 12	288 ± 11	22o ± 9	1o6 ± 4	o,9897	$5,6o4 \times 1o^{-8}$
$1o^{-5}$	491 ± 27	419	346 ± 11	278 ± 6	174 ± 16	93 ± 6	o,9959	$4,8o3 \times 1o^{-8}$
$5 \times 1o^{-6}$	486 ± 18	422 ± 2	366 ± 2o	29o ± 4	21o ± 15	1o1 ± 8	o,9888	$5,388 \times 1o^{-8}$
	49o ± 19	422 ± 11	358 ± 16	285 ± 8	2oo ± 25	1oo ± 8		$5,264 \times 1o^{-8}$

Tab. 3-9: Hemmung der AChE durch Paraoxon. Vorinkubation 1 h. - Legende s. Tab. 3-1.

Paraoxon	Ø	$2,5 \times 1o^{-9}$	$5 \times 1o^{-9}$	$1o^{-8}$	$2 \times 1o^{-8}$	$4 \times 1o^{-8}$	Korr.-Koeff.	$I_{k50\%}$
BuThCh								
$1o^{-5}$	737 ± 1o	629 ± 7	5o1 ± 6	374 ± 9	234 ± 1o	83 ± 11	o,9986	$9,768 \times 1o^{-9}$
$5 \times 1o^{-6}$	736 ± 29	636 ± 8	5o2 ± 11	372 ± 4	215 ± 8	84 ± 13	o,9987	$9,645 \times 1o^{-9}$
$2,5 \times 1o^{-6}$	729 ± 23	634 ± 7	5o4 ± 21	373	198 ± 2	98 ± 5	o,9965	$9,667 \times 1o^{-9}$
	734 ± 18	633 ± 7	5o2 ± 1o	373 ± 6	216 ± 17	87 ± 11		$9,693 \times 1o^{-9}$

Tab. 3-8: Hemmung der ChE durch Paraoxon. Vorinkubation 1 h. - Legende s. Tab. 3-1.

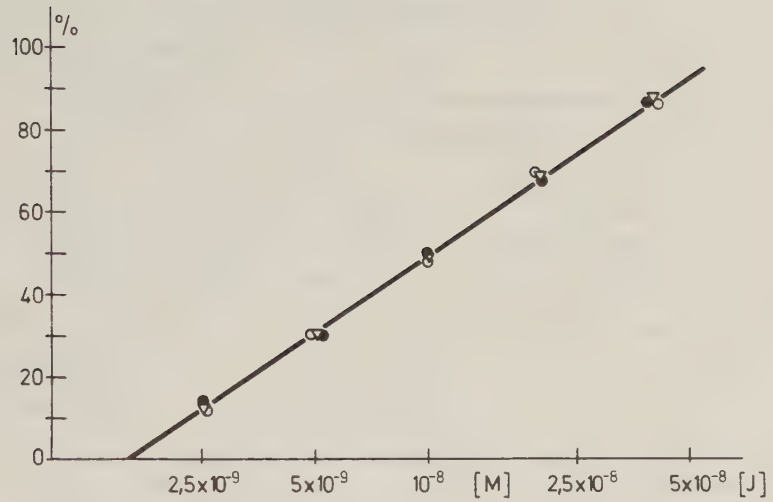


Abb. 3-15: Hemmung der ChE durch Paraoxon. Prozentuale Abnahme des k-Wertes aufgetragen gegen den Logarithmus der Hemmstoffkonzentration. Jeder Punkt stellt das Mittel von je drei Messungen dar. - Substratkonzentrationen ● $1o^{-5}$, ▽ 5 x $1o^{-6}$, o 2,5 x $1o^{-6}$ M. - Vorinkub. 1 h.

zeigt sich auch hier Unabhängigkeit des k von der Substratkonzentration $<1o^{-4}$ molar; wird die prozentuale Abnahme des k halblogarithmisch gegen [I] aufgetragen (Abb. 3-15), ergibt sich eine von den unterschiedlichen Substratkonzentrationen unabhängige Gerade. Wird [I] zwischen $1o^{-9}$ und 5 x $1o^{-8}$ molar gewählt, kann unter den hier beschriebenen Bedingungen eine 0 bis 1oo %ige Hemmung des Enzyms erwartet werden. Bei [I] = 9,69 ($\pm$ o,o7) x $1o^{-9}$ molar erfolgt eine Halbierung des k-Wertes ungehemmter Ansätze. Man vergleiche diesen Wert mit den in Kap. 3.1.5. für $K_{i6o'}$ beschriebenen (7,3 , 9,o , 9,5 und 11,3 x $1o^{-9}$ Mol/l).

AChE wurde 6o Minuten lang mit Paraoxon ($1o^{-8}$, 2 x $1o^{-8}$, 4 x $1o^{-8}$, 8 x $1o^{-8}$ und 1,6 x $1o^{-7}$ molar) vorinkubiert, die Startkonzentration des AcThCh als Substrat betrug 2 x $1o^{-5}$, $1o^{-5}$ und 5 x $1o^{-6}$ Mol/l.

In der Tab. 3-9 sind die errechneten k-Werte dargestellt worden; innerhalb der einzelnen Spalten zeigen sie gute Übereinstimmung. Wird [I] 5 x $1o^{-9}$ molar gewählt, kann unter den hier eingehaltenen Bedingungen keine Hemmung des Enzyms erwartet werden; wird [I] 5 x $1o^{-7}$ molar gewählt, dürfte das Enzym nach 6o min dauernder Vorinkubation vollständig gehemmt sein (lineare Beziehung der prozentualen k-Abnahme gegen [I] ist hier nicht abgebildet). Bei [I] = 5,26 ($\pm$ o,41) x $1o^{-8}$ molar wird $k_{ungeh.}$ halbiert (s. Tab. 3-9). Dieser Wert stimmt gut mit den in Kap. 3.1.5. beschriebenen Werten für $K_{i6o'}$ überein (5,1 und 5,2 x $1o^{-8}$ Mol/l).

4. Besprechung der Ergebnisse

4.1. Graphische Analyse der Meßergebnisse der Aktivitätsmessungen im Substratsättigungsbereich

Wie die Abbildungen des Kap. 3.1. zeigen, kann der Hemmtyp bei doppelt-reziproker Darstellung der Meßergebnisse nach LINEWEAVER-BURK (A) meistens nicht eindeutig bestimmt werden. Dies gelingt erst dann, wenn die gleichen Meßergebnisse auf mehrere verschiedene Arten graphisch dargestellt werden.

Die aus den Daten der Darstellungen A und C bestimmten Werte für die Maximalgeschwindigkeit V_m und die MICHAELIS-Konstante K_m stimmen zwar jeweils gut miteinander überein, doch ist die Standardabweichung der K_m-Werte, bestimmt aus den Geraden in A, zwei- bis dreimal größer als die der aus den Geraden in C bestimmten K_m-Werte (s. Tab. 4-1).

Auch die aus den Geraden in B und D ermittelten Werte für die Hemmkonstanten K_i bzw. αK_i stimmen jeweils gut miteinander überein; die Streuung liegt hier meistens bei $\pm$ 5 % (s. Tab. 4-2). Demgegenüber zeigen die aus Steigungen und Ordinatenabschnitten der Geraden in C errechneten Werte für die Hemmkonstante Standardabweichungen bis zu $\pm$ 30 %, vor allem die aus den Ordinatenabschnitten errechneten K_i-Werte. - Tabelle 4-3 zeigt einige in der Literatur gefundene Werte für K_i, die unter gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Versuchsbedingungen bestimmt worden waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Gemäß der Forderung von WEBB (1963) sollten die Meßergebnisse immer auf mehrere verschiedene Arten zur Darstellung gebracht werden, wenn der Hemmtyp eindeutig

und die Konstanten möglichst genau bestimmt werden sollen. Nach den hier vorgestellten Ergebnissen erweist sich die oft als einzige angewandte Darstellungsart nach LINEWEAVER-BURK (A) als die aussagenschwächste der vier hier angewandten, sofern auf die Zuhilfenahme mathematischer Korrekturtabellen verzichtet wird.

Enzym	Hemmstoff	Darst.	K_m [Mol/l]	
AChE	Pyridostigmin	A_1	$1{,}284\ (\pm\ 0{,}260) \times 10^{-4}$	$1{,}316\ (\pm\ 0{,}574) \times 10^{-4}$
		A_2	$1{,}341\ (\pm\ 0{,}778) \times 10^{-4}$	
		C_1	$1{,}302\ (\pm\ 0{,}156) \times 10^{-4}$	$1{,}264\ (\pm\ 0{,}234) \times 10^{-4}$
		C_2	$1{,}226\ (\pm\ 0{,}308) \times 10^{-4}$	
ChE	Pyridostigmin	A_1	$0{,}880\ (\pm\ 0{,}051) \times 10^{-3}$	$0{,}961\ (\pm\ 0{,}130) \times 10^{-3}$
		A_2	$1{,}016\ (\pm\ 0{,}141) \times 10^{-3}$	
		C_1	$1{,}026\ (\pm\ 0{,}135) \times 10^{-3}$	$1{,}071\ (\pm\ 0{,}151) \times 10^{-3}$
		C_2	$1{,}131\ (\pm\ 0{,}251) \times 10^{-3}$	
AChE	Neostigmin	A_1	$2{,}021\ (\pm\ 0{,}614) \times 10^{-4}$	$2{,}040\ (\pm\ 0{,}449) \times 10^{-4}$
		A_2	$2{,}106\ (\pm\ 0{,}331) \times 10^{-4}$	
		C_1	$2{,}010\ (\pm\ 0{,}238) \times 10^{-4}$	$2{,}136\ (\pm\ 0{,}236) \times 10^{-4}$
		C_2	$2{,}199\ (\pm\ 0{,}212) \times 10^{-4}$	
ChE	Neostigmin	A_1	$1{,}199\ (\pm\ 0{,}083) \times 10^{-3}$	$1{,}148\ (\pm\ 0{,}194) \times 10^{-3}$
		A_2	$1{,}108\ (\pm\ 0{,}256) \times 10^{-3}$	
		C_1	$1{,}199\ (\pm\ 0{,}029) \times 10^{-3}$	$1{,}170\ (\pm\ 0{,}123) \times 10^{-3}$
		C_2	$1{,}151\ (\pm\ 0{,}160) \times 10^{-3}$	
AChE	Edrophonium	A	$4{,}537 \times 10^{-4}$	
		C	$3{,}427 \times 10^{-4}$	
AChE	Tacrin	A	$1{,}367 \times 10^{-4}$	
			$5{,}062\ (\pm\ 1{,}267) \times 10^{-4}$	($\alpha = 3{,}703\ (\pm\ 0{,}927)$)
		C	$1{,}514 \times 10^{-4}$	
			$5{,}496\ (\pm\ 1{,}427) \times 10^{-4}$	($\alpha = 3{,}630\ (\pm\ 0{,}943)$)

Tab. 4-1: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite.

Enzym	Hemmstoff	Darst.	K_m [Mol/l]	
ChE	Tacrin	A	$1{,}061 \times 10^{-3}$	
			$9{,}031\ (\pm\ 2{,}960) \times 10^{-3}$	($\alpha = 8{,}512\ (\pm\ 2{,}790)$)
		C	$1{,}329 \times 10^{-3}$	
			$9{,}333\ (\pm\ 0{,}929) \times 10^{-3}$	($\alpha = 7{,}023\ (\pm\ 0{,}707)$)
AChE	Paraoxon	A_1	$1{,}247\ (\pm\ 0{,}141) \times 10^{-4}$	$1{,}329\ (\pm\ 0{,}741) \times 10^{-4}$
		A_2	$1{,}364\ (\pm\ 0{,}890) \times 10^{-4}$	
		C_1	$1{,}471\ (\pm\ 0{,}162) \times 10^{-4}$	$1{,}416\ (\pm\ 0{,}196) \times 10^{-4}$
		C_2	$1{,}374\ (\pm\ 0{,}218) \times 10^{-4}$	
ChE	Paraoxon	A_1	$9{,}293\ (\pm\ 1{,}267) \times 10^{-4}$	$9{,}950\ (\pm\ 2{,}211) \times 10^{-4}$
		A_2	$10{,}475\ (\pm\ 2{,}793) \times 10^{-4}$	
		C_1	$8{,}998\ (\pm\ 1{,}400) \times 10^{-4}$	$9{,}457\ (\pm\ 1{,}260) \times 10^{-4}$
		C_2	$9{,}917\ (\pm\ 1{,}087) \times 10^{-4}$	

Tab. 4-1: Zusammenstellung sämtlicher K_m-Werte ($\pm$ Standardabw.). Der Index '1' der die Darstellungsart kennzeichnenden Buchstaben bedeutet, daß zur Bestimmung der Konstanten die Schnittpunkte jeder einzelnen Geraden mit der Abszisse gedient haben. Dienten zur K_m-Bestimmung die Schnittpunkte der Geraden untereinander, ist dies durch den Index '2' gekennzeichnet.
Faktor α ist dimensionslos.

Enzym	Hemmstoff	Darst.	K_i [Mol/l]	
AChE	Pyridostigmin	B_1	$1{,}070\ (\pm\ 0{,}046) \times 10^{-6}$	$1{,}215\ (\pm\ 0{,}432) \times 10^{-6}$
		B_2	$1{,}359\ (\pm\ 0{,}634) \times 10^{-6}$	
		D_1	$1{,}081\ (\pm\ 0{,}058) \times 10^{-6}$	$1{,}054\ (\pm\ 0{,}100) \times 10^{-6}$
		D_2	$1{,}026\ (\pm\ 0{,}139) \times 10^{-6}$	
		C_{sl}	$1{,}092\ (\pm\ 0{,}068) \times 10^{-6}$	
		$I_{k50\%}$ =	$0{,}901\ (\pm\ 0{,}002) \times 10^{-6}$	
ChE	Pyridostigmin	B_1	$8{,}460\ (\pm\ 0{,}788) \times 10^{-7}$	$9{,}265\ (\pm\ 1{,}505) \times 10^{-7}$
		B_2	$9{,}802\ (\pm\ 1{,}690) \times 10^{-7}$	
		D_1	$8{,}720\ (\pm\ 0{,}483) \times 10^{-7}$	$8{,}594\ (\pm\ 1{,}692) \times 10^{-7}$
		D_2	$8{,}493\ (\pm\ 2{,}350) \times 10^{-7}$	
		C_{sl}	$9{,}927\ (\pm\ 3{,}403) \times 10^{-7}$	$8{,}920\ (\pm\ 2{,}848) \times 10^{-7}$
		C_{in}	$7{,}913\ (\pm\ 2{,}156) \times 10^{-7}$	
		$I_{k50\%}$ =	$9{,}087\ (\pm\ 0{,}136) \times 10^{-7}$	
AChE	Neostigmin	B_1	$2{,}121\ (\pm\ 0{,}070) \times 10^{-8}$	$2{,}197\ (\pm\ 0{,}249) \times 10^{-8}$
		B_2	$2{,}272\ (\pm\ 0{,}366) \times 10^{-8}$	
		D_1	$2{,}153\ (\pm\ 0{,}063) \times 10^{-8}$	$2{,}176\ (\pm\ 0{,}133) \times 10^{-8}$
		D_2	$2{,}198\ (\pm\ 0{,}198) \times 10^{-8}$	
		C_{sl}	$2{,}167\ (\pm\ 0{,}400) \times 10^{-8}$	$1{,}749\ (\pm\ 0{,}559) \times 10^{-8}$
		C_{in}	$1{,}332\ (\pm\ 0{,}330) \times 10^{-8}$	
		$I_{k50\%}$ =	$2{,}068\ (\pm\ 0{,}059) \times 10^{-8}$	
ChE	Neostigmin	B_1	$5{,}038\ (\pm\ 0{,}014) \times 10^{-8}$	$5{,}060\ (\pm\ 0{,}077) \times 10^{-8}$
		B_2	$5{,}082\ (\pm\ 0{,}113) \times 10^{-8}$	
		D_1	$5{,}013\ (\pm\ 0{,}059) \times 10^{-8}$	$4{,}972\ (\pm\ 0{,}098) \times 10^{-8}$
		D_2	$4{,}931\ (\pm\ 0{,}124) \times 10^{-8}$	
		C_{sl}	$5{,}649\ (\pm\ 0{,}725) \times 10^{-8}$	$5{,}964\ (\pm\ 1{,}099) \times 10^{-8}$
		C_{in}	$6{,}280\ (\pm\ 1{,}644) \times 10^{-8}$	
		$I_{k50\%}$ =	$5{,}586\ (\pm\ 0{,}143) \times 10^{-8}$	

Tab. 4-2: Fortsetzung u. Legende siehe nächste u. übernächste Seite.

Enzym	Hemmstoff	Darst.	K_i [Mol/l]	
AChE	Edrophonium	B	$2{,}296\ (\pm\ 0{,}097) \times 10^{-7}$	
		C_{in}	$2{,}104\ (\pm\ 0{,}120) \times 10^{-7}$	
		$I_{k50\%}$	$= 1{,}544\ (\pm\ 0{,}026) \times 10^{-7}$	
AChE	Tacrin	B	$4{,}603\ (\pm\ 0{,}244) \times 10^{-8}$	
		C_{in}	$4{,}052\ (\pm\ 0{,}252) \times 10^{-8}$	
		C_{sl}	$1{,}457\ (\pm\ 0{,}087) \times 10^{-7}$	$(\alpha = 3{,}520\ (\pm\ 0{,}191))$
		D	$1{,}290\ (\pm\ 0{,}470) \times 10^{-7}$	
		$I_{k50\%}$	$= 2{,}905\ (\pm\ 0{,}037) \times 10^{-8}$	
ChE	Tacrin	B	$3{,}532\ (\pm\ 0{,}003) \times 10^{-8}$	
		C_{in}	$3{,}905\ (\pm\ 0{,}315) \times 10^{-8}$	
		C_{sl}	$2{,}629\ (\pm\ 0{,}079) \times 10^{-7}$	$(\alpha = 7{,}055\ (\pm\ 0{,}434))$
		D	$3{,}061\ (\pm\ 0{,}016) \times 10^{-7}$	
		$I_{k50\%}$	$= 1{,}682\ (\pm\ 0{,}029) \times 10^{-8}$	
AChE	Paraoxon	B_1	$5{,}099\ (\pm\ 0{,}040) \times 10^{-8}$	
		B_2	$5{,}308\ (\pm\ 0{,}920) \times 10^{-8}$	$5{,}204\ (\pm\ 0{,}593) \times 10^{-8}$
		D_1	$5{,}096\ (\pm\ 0{,}067) \times 10^{-8}$	
		D_2	$5{,}062\ (\pm\ 0{,}288) \times 10^{-8}$	$5{,}097\ (\pm\ 0{,}188) \times 10^{-8}$
		C_{sl}	$6{,}719\ (\pm\ 1{,}078) \times 10^{-8}$	
		C_{in}	$5{,}186\ (\pm\ 1{,}722) \times 10^{-8}$	$5{,}953\ (\pm\ 1{,}562) \times 10^{-8}$
		$I_{k50\%}$	$= 5{,}264\ (\pm\ 0{,}413) \times 10^{-8}$	
ChE	Paraoxon	B_1	$9{,}315\ (\pm\ 0{,}133) \times 10^{-9}$	
		B_2	$8{,}630\ (\pm\ 0{,}286) \times 10^{-9}$	$8{,}972\ (\pm\ 0{,}425) \times 10^{-9}$
		D_1	$9{,}344\ (\pm\ 0{,}209) \times 10^{-9}$	
		D_2	$9{,}716\ (\pm\ 0{,}503) \times 10^{-9}$	$9{,}530\ (\pm\ 0{,}400) \times 10^{-9}$
		C_{sl}	$11{,}338\ (\pm\ 0{,}483) \times 10^{-9}$	
		C_{in}	$7{,}314\ (\pm\ 1{,}010) \times 10^{-9}$	$8{,}923\ (\pm\ 2{,}350) \times 10^{-9}$
		$I_{k50\%}$	$= 9{,}693\ (\pm\ 0{,}066) \times 10^{-9}$	

Tab. 4-3: Legende siehe

Tab. 4-2: Zusammenstellung sämtlicher Werte für K_i und αK_i ($\pm$ Standardabweichung).
Zur Bedeutung der Indizes '1' und '2' an den Darstellungskennzeichnungen siehe Legende zur Tab. 4-2.
Die Indizes 'sl' und 'in' geben an, ob die Berechnung des K_i aus den Steigungen (sl) oder Ordinatenabschnitten (in) der Geraden in C erfolgte.
$I_{k50\%}$ gibt jeweils diejenige Inhibitorkonzentration an, durch die bei Aktivitätsmessung bei Substrat-"Mangel" Halbierung des k-Wertes ungehemmter Ansätze erzielt wird.

Enzym	Hemmstoff	I_{50} bzw. K_i [Mol/l]	zitiert nach
AChE	Pyridostigmin	$1{,}6 \times 10^{-6}$ (I_{50})	WILSON et al., 1961
AChE	Neostigmin	$2{,}7 \times 10^{-8}$ (I_{50})	WILSON et al., 1961
ChE	Neostigmin	$1{,}6 \times 10^{-8}$ (I_{50})	BERGMANN u. WURZEL, 1954
AChE	Paraoxon	$2{,}14 \times 10^{-8}$ (I_{50})	ALDRIDGE, 1950
AChE	Paraoxon	$2{,}1 \times 10^{-8}$ (I_{50})	ALDRIDGE, 1953
ChE	Paraoxon	$5{,}4 \times 10^{-8}$ (I_{50})	ALDRIDGE, 1953
AChE	Edrophonium	$1{,}41 \times 10^{-7}$ (K_i)	BARNETT u. ROSENBERRY, 1977
AChE	N-Methylamino-acridin	$2{,}0 \times 10^{-7}$ (K_i)	MOOSER u. SIGMAN, 1974

Tab. 4-3: Zusammenstellung einiger Werte für I_{50} bzw. K_i, die unter Versuchsbedingungen ähnlich den in dieser Arbeit beschriebenen bestimmt worden sind.
I_{50} bezeichnet diejenige Inhibitorkonzentration, die eine Aktivitätsabnahme um 50 % bewirkt. Bei Vorliegen von Nonkompetition ist $I_{50} = K_i$ (siehe COHEN u. OOSTERBAAN, 1963). - Für N-Methylaminoacridin ist der K_i des kompetitiven Anteils des zusammengesetzten Hemmtyps angegeben.

4.2. Hemmtypen und ihr molekularer Mechanismus

Die (A)ChE-Inhibitoren Edrophonium, Neostigmin, Pyridostigmin, Tacrin und auch Paraoxon erfüllen alle die von einigen Autoren für das Vorliegen von kompetitiver Hemmung als ausreichend empfundene Bedingung, mit dem Substratmolekül um die gleiche Stelle, dem 'active center' des Enzyms zu konkurrieren (vergl. S. 2f.

Ein rein kompetitiver Antagonismus liegt nach der graphischen Auswertung der Meßergebnisse aber nur bei Hemmung durch Edrophonium vor. Dieser nichtacylierende Esterase-Hemmstoff lagert sich nur an das anionische Zentrum des 'active center' an (vergl. WERMUTH u. BRODBECK, 1973; BARNETT u. ROSENBERRY, 1977), wobei die Bindung nur durch elektrostatische und van der Waalssche Kräfte erfolgt. Der Grad der Hemmung durch Edrophonium erwies sich als unabhängig von der Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit dem Inhibitor. Es stellt sich also nach Konzentrationsänderung eines der beiden Konkurrenten augenblicklich ein Gleichgewicht zwischen [E], [I], [EI] und [ES] gemäß dem Massenwirkungsgesetz ein, was eine Bedingung für das Vorliegen von kompetitiver Hemmung sein sollte.

Zeigt eine Graphik Kompetition an, darf rückgeschlossen werden, daß der angewandte Inhibitor mit dem Substrat um die gleiche Stelle am Enzym konkurriert - das 'active center' also entweder vom Substrat- oder vom Inhibitormolekül besetzt wird - und daß die Konkurrenten sich gegenseitig entsprechend ihrer Konzentration(sänderung) vom aktiven Zentrum (bzw. Rezeptor) verdrängen.

Wird bei Hemmung durch die Carbaminsäureester Neostigmin und Pyridostigmin (A)ChE so lange mit dem Inhibitor vorinkubiert,

bis sich ein Gleichgewicht zwischen [E], [I] und [EI] eingestellt hat - der Grad der Hemmung ist erst nach 8o - 12o Minuten maximal und konstant - , liegt nach der graphischen Analyse reine Nonkompetition vor. Berücksichtigt man die bekannten molekularen Vorgänge der Wechselwirkung zwischen Esterase und Vertretern dieser Art Hemmstoffe, kann dieses Ergebnis folgendermaßen erklärt werden: Über den Schritt der reversiblen Komplexbildung durch das Inhibitor-Molekül und dem anionischen und esteratischen Zentrum des Enzyms, stabilisiert durch elektrostatische und van der Waalssche Kräfte, erfolgt die Carbamoylierung des esteratischen Zentrums, wobei die Bindung kovalent ist. Die Decarbamoylierung, d.h. Reaktivierung des Enzyms, erfolgt viel langsamer als die Carbamoylierung (vergl. O'BRIEN et al., 1966) oder der analoge Schritt der Deacetylierung des Enzyms nach Reaktion mit dem Substrat Acetylcholin. Carbamoyliertes Enzym ist also den konkurrierenden Antagonisten Inhibitor und Substrat für endliche Zeit entzogen, worauf auch eine Erhöhung der Substratkonzentration keinen Einfluß hat. Damit ist eine wichtige Bedingung für das Vorliegen von Kompetition nicht erfüllt, jedoch entspricht die "Überführung eines Teils des Enzyms in eine inaktive Form", wodurch eine Abnahme der Maximalgeschwindigkeit V_m bewirkt wird, der Vorstellung von Nonkompetition (vergl. PRICE u. DWEK, 1979).

Da Neostigmin und Pyridostigmin mit dem Substrat um jedes deacylierte Esterase-Molekül konkurrieren, um als ersten Schritt der Reaktion einen reversiblen Komplex zu bilden, sollte eigentlich auch ein kompetitiver Hemmungsanteil vorhanden sein. Vermutlich ist er derart gering, daß er mit Hilfe der angewandten Auswertungsmethode nicht mehr erfaßt werden kann. Vollständige Kompetition

wird graphisch angezeigt, wenn die Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat um das freie aktive Zentrum des Enzyms das entscheidende Prinzip darstellt, wenn also noch kein - oder nur sehr wenig - für längere Zeit inaktiviertes Enzym vorliegt, was dann der Fall ist, wenn auf Vorinkubation verzichtet und statt dessen sofort nach Durchmischen von Inhibitor und Enzym die Aktivitätsmessung vorgenommen wird. FELLMAN u. FUJITA (1964) zeigten, daß sich die Graphik bei Anwendung eines carbamoylierenden Inhibitors in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation von reiner Kompetition zu reiner Nonkompetition ändert.

SCHMIDT et al. (1977) untersuchten eine größere Anzahl synthetisierter Carbaminsäureester: nach der graphischen Auswertung der Meßergebnisse nach DIXON hemmten diejenigen Carbaminsäureester kompetitiv, die sehr schnell einen reversiblen Enzym-Inhibitor-Additionskomplex bildeten, bei denen die Carbamoylierung des esteratischen Zentrums aber den langsamsten Reaktionsschritt darstellte. Carbaminsäureester mit schlechter Komplexbildungseigenschaft, aber guter Carbamoylierungsfähigkeit, hemmten nonkompetitiv; bei ihnen war wie bei Neostigmin und Pyridostigmin der Schritt der Decarbamoylierung der langsamste.

Wie schon in Kap. 1. beschrieben, besteht seit langem Übereinstimmung darüber, daß die Reaktionsschritte der (A)ChE-Hemmung durch phosphorylierende Inhibitoren (Organophosphate, sogenannte irreversible Esterase-Inhibitoren) denen der carbamoylierenden entsprechen (vergl. WILSON et al., 196o; WILSON et al., 1961; MAIN u. IVERSON, 1966; MAIN u. HASTINGS, 1966). Der entscheidende Unterschied liegt in der Geschwindigkeit des Schrittes der

spontanen Deacylierung; und zwar geschieht die Dephosphorylierung sehr langsam (WILSON et al., 1958), so daß das Enzym zumindest für die Dauer des Versuchs (Stunden bis Tage) als praktisch irreversibel gehemmt angesehen werden muß. Der Hemmstoff bewirkt also eine langdauernde Inaktivierung eines Teils der Enzym-Menge, es dürfen bei der graphischen Analyse der Meßergebnisse die für die Nonkompetition typischen Kurvenverläufe erwartet werden (vergl. Kap. 3.1.5.).

Unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse und Überlegungen sollten die idealisierten Beschreibungen von Kompetition und Nonkompetition wie folgt formuliert werden:

Kompetition soll heißen: Substrat- und Inhibitormolekül konkurrieren um die gleiche Stelle am Enzym (bzw. Rezeptor), es kann nur das Substrat- oder das Inhibitormolekül gebunden werden. Bei Konzentrationsänderung eines Konkurrenten stellt sich augenblicklich ein neues Gleichgewicht gemäß dem Massenwirkungsgesetz zwischen [E], [I], [EI] und [ES] ein; d.h. die Dissoziationsgeschwindigkeiten der reversiblen [ES]- und [EI]-Komplexe liegen in vergleichbarer Größenordnung, der Dissoziationsschritt ist nicht der langsamste (d.h. geschwindigkeitsbestimmende) der Reaktion.

Zeigt die Graphik unabhängig von der Dauer der Vorinkubation reine Kompetition an, darf auf Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor um die gleiche Stelle am Enzym, von dem sie sich entsprechend ihrer Konzentration(sänderung) gegenseitig verdrängen, rückgeschlossen werden.

Nonkompetition soll heißen: Verminderung der Maximalgeschwindigkeit V_m bei gleichbleibendem K_m entspricht einer "Überführung eines Teils des Enzyms in eine inaktive Form" (PRICE u. DWEK, 1979). Diese Inaktivierung kann erfolgen, wenn der Inhibitor außerhalb des aktiven Zentrums mit dem Enzym (bzw. Rezeptor) reagiert und dadurch die Substratanlagerung und/oder die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Substratkomplexes verzögert (s. S. 3). Die Inaktivierung eines Teils des Enzyms kann aber auch dadurch erfolgen, daß der Inhibitor das aktive Zentrum des Enzyms für längere Zeit blockiert und dadurch eine Substratanlagerung für begrenzte Zeitdauer ausschließt, woran auch eine Konzentrationserhöhung des Substrats nichts ändert. Ist die Dissoziationsgeschwindigkeit des Enzym-Inhibitor-Komplexes sehr klein, erscheint die Inaktivierung des Enzyms über den Beobachtungszeitraum progredient und praktisch irreversibel.

Zeigt die Graphik Nonkompetition an, kann nur daraus nicht eindeutig auf den molekularen Mechanismus der Hemmung geschlossen werden. Ergibt die graphische Analyse das Bild der Nonkompetition unabhängig von der Dauer der Vorinkubation, dürfte der Inhibitor außerhalb des aktiven Zentrums mit dem Enzym reagieren und über eine Konformationsänderung Substratanlagerung und/oder Dissoziation des [EIS]-Komplexes bewirken. - Nimmt bei Verkürzung der Vorinkubationsdauer die nachgewiesene Nonkompetition zugunsten eines kompetitiven Anteils ab (siehe Ergebnisse von FELLMAN u. FUJITA, 1964), kann Blockierung des aktiven Zentrums vermutet werden, wobei die Restitution des Enzyms nach Reaktion mit dem Inhibitor deutlich langsamer erfolgt als nach Reaktion mit dem Substrat.

Tatsächlich wirken nicht alle Substanzen mit inhibitorischem Effekt auf die (A)ChE derart, daß der Inhibitor nur mit dem anionischen und/oder esteratischen Zentrum des 'active center' reagiert.

Hemmung der AChE durch die Muskelrelaxantien d-Tubocurarin, Gallamin, Succinyldicholin u.a. oder durch diese in Kombination mit Esteraseinhibitoren anderer Stoffgruppen führte zu Ergebnissen, die Autoren wie CHANGEUX (1966), WOMBACHER u. WOLF (1970) und KITZ et al. (1970) das Vorhandensein eines peripheren (d.h. abseits des 'active center' lokalisierten) anionischen Zentrums annehmen ließen. Für den bei der graphischen Analyse der Meßergebnisse nachgewiesenen kompetitiven Anteil der Hemmung sollte die direkte Blockierung des 'active center' durch die Muskelrelaxantien verantwortlich sein. Dem nonkompetitiven Anteil des gemischten Hemmtyps sollte eine Konformationsänderung des Enzym-Moleküls zugrunde liegen, die durch Anlagerung des Inhibitors an das periphere anionische Zentrum bewirkt worden sein sollte.

Einen aus kompetitiven und nonkompetitiven Anteilen zusammengesetzten Hemmtyp findet man auch bei Esterase-Inhibition durch Acridinderivate (MOOSER et al., 1972; WERMUTH u. BRODBECK, 1973; MOOSER u. SIGMAN, 1974; s. auch Kap. 3.1.4.), eine Substanzgruppe, deren Abkömmlinge in vielen Bereichen in Forschung und Klinik Anwendung finden (beispielsweise wirkt Aethacridin (Rivanol^{R}) als lokales Antiseptikum; 9-Aminoacridin, 3,6-Diaminoacridin u.a. hemmen DNA-Polymerase und binden an native DNA (BÖHNER u. HAGEN, 1977)). - 1,2,3,4-Tetrahydro-9-aminoacridin (Tacrin) verlängert die Wirkung des depolarisierenden Muskelrelaxans Succinyldicholin

um das Drei- bis Vierfache (SMART, 1964; HUNTER, 1970; NORMAN u. MORGAN, 1975); Tacrin vermag die Bluthirnschranke zu penetrieren und somit auch zentral zu wirken, was therapeutisch beim anticholinergischen Syndrom genutzt werden kann (MENDELSON, 1975).

Die Ergebnisse der simultanen AChE-Hemmung sowohl durch die Acridinderivate N-Methylacridin (MOOSER et al., 1972; MOOSER u. SIGMAN, 1974), 3,6-Diamino-10-methylacridin (Acriflavin) oder 3,6-Diaminoacridin (Proflavin) (WERMUTH u. BRODBECK, 1974) als auch durch Muskelrelaxantien, Atropin, Nicotin oder Edrophonium ließen die Autoren schließen, daß Acridinderivate kompetitiv hemmen, indem sie mit dem Substrat um das anionische Zentrum des 'active center' konkurrieren und sich dort entsprechend ihrer Konzentration gegenseitig verdrängen; daß sie ferner nonkompetitiv hemmen durch Komplexbildung zwischen dem Inhibitor und dem acylierten Enzym, wodurch die spontane Deacylierung (d.h. Restitution) des Enzyms deutlich verzögert wird. Es wurde ein molekularer Hemm-Mechanismus ähnlich dem bei der Esterase-Hemmung durch Muskelrelaxantien diskutiert, doch schlossen ROSENBERRY u. NEUMANN (1977) und BARNETT u. ROSENBERRY (1977) aufgrund ihrer Ergebnisse aus, daß das von ihnen verwendete N-Methylacridin an einem der zahlreichen peripheren anionischen Zentren mit dem Enzym reagiert; die Komplexbildung des Inhibitors mit dem acylierten Enzym soll erfolgen, indem das Acridinderivat an das anionische Zentrum des 'active center' bindet.

Zeigt die Graphik einen aus Kompetition und Nonkompetition zusammengesetzten Hemmtyp an, der unabhängig von der Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit dem Hemmstoff reproduzierbar ist,

kann geschlossen werden, daß der Inhibitor das aktive Zentrum (bzw. den Rezeptor) reversibel blockiert, Substrat und Inhibitor verdrängen sich gegenseitig entsprechend ihrer Konzentration(sänderung); dem nonkompetitiven Anteil der Hemmung kann eine Konformationsänderung des Enzym-Moleküls durch Inhibitoranlagerung an eine Stelle außerhalb des 'active center' oder - wie bei den Acridinderivaten beschrieben - eine Besetzung des anionischen Zentrums des 'active center' zugrunde liegen, während das esteratische Zentrum noch acyliert ist. Es resultiert in jedem Fall eine Verzögerung der Enzym-Substrat-Komplexbildung und/oder der Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex-Dissoziation, was sich in der Verminderung der Maximalgeschwindigkeit V_m manifestiert.

Ändert sich das Verhältnis von kompetitivem zu nonkompetitivem Anteil mit Variation der Vorinkubationsdauer in dem Sinne, daß der nonkompetitive Anteil mit der Zeit zunimmt, kann ein Hemm-Mechanismus analog dem der acylierenden (A)ChE-Inhibitoren vermutet werden.

4.3. Graphische Analyse der Meßergebnisse der Aktivitätsmessungen im Substrat-"Mangel"-Bereich

Wird die Substratkonzentration unter 10^{-4} M gesenkt - was physiologische Verhältnisse besser simulieren dürfte als Substratsättigung - , findet sich eine Reaktionskinetik 1. Ordnung: die Substratkonzentration im Ansatz sinkt gemäß einer Halbwertszeit. Vergrößerung dieser Halbwertszeit bzw. Verminderung des logarithmischen Dekrements k stellen deshalb ein Maß für die Aktivitätsabnahme des Enzyms dar (vergl. DROSS, 1977; Kap. 2.2.2.; Kap. 3.2.).

Werden die absoluten oder relativen k-Werte (relativ zum k ungehemmter Ansätze) im halblogarithmischen Raster gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen, kann aus dem Verlauf der Geraden abgelesen werden, in welchem Hemmstoffkonzentrationsbereich 0 bis 1oo %ige Aktivitätsminderung des Enzyms erzielt wird. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Beziehung zwischen k und dem Logarithmus der Inhibitorkonzentration, deren Linearität im Bereich 15 - 85 %iger Abnahme von k gezeigt werden konnte, auch im Bereich unter 15 und über 85 % nicht wesentlich von der Linearität abweicht. - Die Konstanten V_m und K_m können nicht bestimmt werden. Da die k-Werte nur von der Inhibitor-, nicht aber von der Substratkonzentration $<1o^{-4}$ M beeinflußt werden (vergl. Tabellen des Kap. 3.2.), ist die Differenzierung des Hemmtyps nicht möglich.

Diejenige Hemmstoffkonzentration, die eine Halbierung des k ungehemmter Ansätze bewirkt, stimmt sehr gut mit dem jeweils bei Anwendung der klassischen Methode bestimmten Wert für K_i überein, vorausgesetzt, es handelt sich um einen rein kompetitiven oder rein nonkompetitiven Antagonismus (Tab. 4-2). Liegt ein aus kompetitivem und nonkompetitivem Anteil zusammengesetzter Mischtyp vor, wird die Halbierung des k-Wertes von einer Inhibitorkonzentration bewirkt, deren Wert unter dem des kleineren der den beiden unterschiedlichen Anteilen zuzuordnenden K_i's liegt (Tab. 4-2: Tacrin). Die Potenz eines gemischt hemmenden Antagonisten kann somit durch ein "Gesamt-K_i" quantifiziert werden, welches aus den Werten für K_i und αK_i der entsprechenden Hemmungsanteile nicht bestimmt werden kann.

Dieses Ergebnis dürfte die Methode der Aktivitätsmessung bei Substrat-"Mangel" für toxikologische Fragestellungen interessant werden lassen: wenn es nämlich weniger das Ziel ist, den Hemmtyp eines Antagonisten zu bestimmen, sondern wichtiger ist, die inhibitorische Potenz eines Gemisches verschiedener bekannter und/oder unbekannter Inhibitoren zu quantifizieren. Der experimentelle Aufwand, den die hier angewandte Methode fordert, ist geringer als der bei Durchführung der Aktivitätsmessung im Substratsättigungsbereich: es brauchen nur drei verschiedene Inhibitorkonzentrationen bei einer beliebigen Substratkonzentration $<1o^{-4}$ M gewählt werden, ferner ist ein Ansatz ohne Hemmstoff zu messen. Bei Dreifachbestimmung werden also nur 12 Messungen benötigt, um den Verlauf der Geraden im halblogarithmischen Raster (k gegen [I]) ausreichend genau bestimmen zu können.

Als ein weiterer Vorteil der hier besprochenen Methode kann gewertet werden, daß die Ergebnisse der in-vitro-Experimente bis zu einem gewissen Grad auf in-vivo-Verhältnisse übertragen werden können: beispielsweise lassen sich Aussagen über die in-vivo-Hemmung eines Enzyms machen, nachdem die Inhibitorkonzentration im entsprechenden Organ(system) ausreichend genau bestimmt oder geschätzt werden konnte (DROSS, 1977).

5. Zusammenfassung

Acetylcholinesterase aus Electrophorus electricus und Cholinesterase aus Pferdeserum wurden durch Pyridostigmin, Neostigmin, Edrophonium, Tacrin und Paraoxon gehemmt.

Die Meßergebnisse der klassischen Aktivitätsbestimmung im Substratsättigungsbereich wurden neben der meistbenutzten doppelt-reziproken Darstellungsart nach LINEWEAVER-BURK noch auf drei weitere Arten graphisch dargestellt. So konnten die Maximalgeschwindigkeit V_m , die MICHAELIS-Konstante K_m , die Hemmkonstante K_i und der Hemmtyp bestimmt werden, wobei sich die doppelt-reziproke Darstellungsart als die aussagenschwächste erwies.

Sämtliche hier angewandten (A)ChE-Inhibitoren reagieren mit dem anionischen und/oder dem esteratischen Zentrum des 'active center' und verhindern dadurch eine Substratanlagerung an dieser Stelle des Enzyms. Nach den gängigen Vorstellungen vom molekularen Mechanismus der Enzymhemmung spräche dies eher für Kompetition (Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die gleiche Stelle am Enzym) als für Nonkompetition (Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym an einem Ort außerhalb des 'active center').

Die graphische Analyse der Meßergebnisse ergab jedoch nur für Edrophonium Kompetition, für Pyridostigmin, Neostigmin und Paraoxon Nonkompetition, für Tacrin einen Mischtyp aus Kompetition und Nonkompetition. Diese Ergebnisse konnten erklärt werden, da die Reaktionsschritte der (A)ChE-Hemmung durch die hier verwendeten Inhibitoren bekannt sind, doch wurde damit auch die Unzulänglichkeit der idealisierten Beschreibungen von molekularen Mechanismen der einzelnen Hemmtypen deutlich.

Kompetition liegt nicht grundsätzlich dann vor, wenn Substrat und Inhibitor um das 'active center' konkurrieren; die Konkurrenten müssen sich dank ihres molekularen Reaktionsmechanismus gegenseitig vom 'active center' gemäß ihrer Konzentration(sänderung) verdrängen können. - Nonkompetition bedeutet 'Überführung eines Teils des Enzyms in eine inaktive Form': V_m nimmt ab. Neben den normalerweise beschriebenen molekularen Vorgängen kann dies auch dadurch bewirkt werden, daß der Inhibitor das 'active center' für relativ lange Zeit blockiert, was den nonkompetitiven Hemmstoff Paraoxon die Esterasen praktisch irreversibel hemmen läßt.

Liegt Substrat in einer Konzentration unter $1o^{-4}$ molar vor, erfolgt die enzymatische Hydrolyse gemäß einer Reaktion 1. Ordnung. Das logarithmische Dekrement k als Geschwindigkeitsmaß der Reaktion wurde berechnet: k erwies sich als unabhängig von der Substratkonzentration $<1o^{-4}$ molar; zwischen der relativen k-Abnahme bei Hemmung der (A)ChE durch Pyridostigmin, Neostigmin, Edrophonium, Tacrin und Paraoxon und dem Logarithmus der Inhibitorkonzentration ergab sich eine lineare Beziehung, so daß der Hemmstoffkonzentrationsbereich angegeben werden kann, in dem 0 bis 1oo %ige Enzymhemmung erfolgt.

V_m , K_m und Hemmtypen können nicht bestimmt werden, doch erfolgt die Halbierung des k ungehemmter Ansätze bei einer Inhibitorkonzentration ($I_{k5o\%}$), die numerisch dem bei Substrat-Sättigung bestimmten K_i entspricht, vorausgesetzt, es liegt ein rein kompetitiver oder rein nonkompetitiver Antagonismus zugrunde. Im Falle des Mischtyps (Tacrin) liegt der $I_{k5o\%}$ unter dem kleineren der den beiden Hemmungsanteilen zuzuordnenden K_i's.

Diese Methode, bei der nur mit einer Substratkonzentration $\leq 1o^{-4}$ molar gearbeitet werden muß, bietet sich an, wenn es gilt, die inhibitorische Potenz eines Hemmstoffgemisches verschiedener bekannter und/oder unbekannter Inhibitoren zu quantifizieren.

6. Literaturverzeichnis

ALDRIDGE, W.N.: Some Properties of Specific Cholinesterase with Particular Reference to the Mechanisme of Inhibition by Diethyl p-nitrophenyl Thiophosphate (E 605) and Analogues; Biochem. J. 46, 451 - 460 (1950)

ALDRIDGE, W.N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-esters of Phosphoric Acid; Biochem. J. 54, 442 - 448 (1953)

ALDRIDGE, W.N., A.N. DAVISON: The Mechanisme of Inhibition of Cholinesterases by Organophophorus Compounds; Biochem. J. 55, 763 - 766 (1953)

AUGUSTINSSON, K.-B., D. NACHMANSOHN: Studies on Cholinesterase - VI. Kinetics of the Inhibition of Acetylcholine Esterase; J. Biol. Chem. 179, 543 - 559 (1949)

BARNETT, P., T.L. ROSENBERRY: Catalysis by Acetylcholinesterase. Acceleration of the Hydrolysis of Neutral Acetic Esters by Certain Aromatic Cations; J. Biol. Chem. 252, 7200 - 7206 (1977)

BERGMANN, F., M. WURZEL: The Structure of the Active Surface of Serum Cholinesterase; Biochim. Biophys. Acta 19, 251 - 259 (1954)

BÖHNER, R., U. HAGEN: Action of Intercalating Agents of the Activity of DNA Polymerase I; Biochim. Biophys. Acta 479, 300 - 310 (1977)

BUDDECKE, E: Grundriß der Biochemie; 4., neubearbeitete Aufl.; W. de Gruyter, Berlin - New York 1974

CHANGEUX, J.-P.: Responses of Acetylcholinesterase from 'Torpedo marmorata' to Salts and Curarizing Drugs; Mol. Pharmacol. 2, 369 - 392 (1966)

COHEN, J.A., R.A. OOSTERBAAN: The Active Site of Acetylcholinesterase and Related Esterases and its Reactivity towards Substrates and Inhibitors, in: KOELLE, G.B.: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk Band XV; Springer, Berlin - Heidelberg - New York 1963

DAVISON, A.N.: Return to Cholinesterase Activity in the Rat after Inhibition by Organophosphorus Compounds; Biochem. J. 54, 583 - 590 (1953)

DIXON, M.: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants; Biochem. J. 55, 170 - 171 (1953)

DROSS, K.: Die Bedeutung der cholinesterasehemmenden Eigenschaften für die Toxizität und neuromuskuläre Wirkungen von Sulpirid; Arzneimittel-Forschung (Drug Research) 27, 404 - 406 (1977)

ELLMANN, G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES, R.M. FEATHERSTONE: A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity; Biochem. Pharmacol. 7, 88 - 95 (1961)

FELLMAN, J.H., T.S. FUJITA: The Acylation of Cholinesterase by Carbamylcholine; Biochim. Biophys. Acta 89, 360 - 362 (1964)

HUNTER, A.R.: An Appraisal of Tacrine-extended Suxamethonium; Brit. J. Anaesth. 42, 155 - 162 (1970)

IVERSON, F.: Binding Constants for Tetramethylammonium Ion Determined with Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase; Can. J. Biochem. 54, 918 - 920 (1976)

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie; 9., neubearbeitete Aufl.; Thieme, Stuttgart 1974

KEWITZ, H., I.B. WILSON, D. NACHMANSOHN: A Specific Antidote against Lethal Alkyl Phosphate Intoxication. - II. Antidotal Properties; Arch. Biochem. Biophys. 64, 456 - 465 (1956)

KITZ, R.J., L.M. BRASWELL, S. GINSBURG: On the Question: Is Acetylcholinesterase an Allosteric Protein? Mol. Pharmacol. 6, 108 - 121 (1970)

KOELLE, G.B.: Anticholinesterase Agents, in: GOODMAN, L.S., A. GILMAN: The Pharmacological Basis of Therapeutics; The Macmillan Company, 4th Edition, London - Toronto 1971

KOROLKOVAS, A.: Grundlagen der molekularen Pharmakologie; Thieme, Stuttgart 1974

LEHNINGER, A.L.: Biochemie; 2., neubearbeitete und erweiterte Aufl.; Verlag Chemie, Weinheim - New York 1977

MAIN, A.R.: Affinity and Phosphorylation Constants for the Inhibition of Esterases by Organophosphates; Science 144, 992 - 993 (1964)

MAIN, A.R., F.L. HASTINGS: A Comparison of Acylation, Phosphorylation and Binding in Related Substrates and Inhibitors of Serum Cholinesterase; Biochem. J. 101, 584 - 590 (1966)

MAIN, A.R., F. IVERSON: Measurement of the Affinity and Phosphorylation Constants Governing Irreversible Inhibition of Cholinesterase by Di-isopropyl Phosphorofluoridate; Biochem. J. 100, 525 - 531 (1966)

MENDELSON, G.: Central Anticholinergic Syndrome Reversed by Tetrahydroaminacrine (THA); Med. J. Aust. 2, 906 - 909 (1975)

MOOSER, G., H. SCHULMAN, D.S. SIGMAN: Fluorescent Probes of Acetylcholinesterase; Biochemistry 11, 1595 - 1602 (1972)

MOOSER, G., D.S. SIGMAN: Ligand Binding Properties of Acetylcholinesterase Determined with Fluorescent Probes; Biochemistry 13, 2299 - 2307 (1974)

MYERS, D.K.: Studies on Cholinesterase - Return of Cholinesterase Activity in the Rat after Inhibition by Carbamoyl Fluorides; Biochem. J. 62, 556 - 563 (1956)

MYERS, D.K., A. KEMP: Inhibition of Esterases by the Fluorides of Organic Acids; Nature 173, 33 - 34 (1954)

NACHMANSOHN, D., I.B. WILSON: The Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Acetylcholine; Adv. in Enzymology 12, 259 - 339 (1951)

NORMAN, J., M. MORGAN: The Effect of Tacrine on the Neuromuscular Block Produced by Suxamethonium in Man; Brit. J. Anaesth. 47, 1027 (1975)

O'BRIEN, R.D., B.D. HILTON, L. GILMOUR: The Reaction of Carbamates with Cholinesterase; Mol. Pharmacol. 2, 593 - 605 (1966)

PRICE, N.C., R.A. DWEK: Physikalische Chemie für Biologen und Biochemiker; UTB 785, Darmstadt 1979

RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie; 7. Aufl.;
Berlin 1977

ROSENBERRY, T.L., E. NEUMANN: Interaction of Ligands with Acetylcholinesterase. Use of Temperature-Jump Relaxation Kinetics in the Binding of Specific Fluorescent Ligands;
Biochemistry 16, 3870 - 3878 (1977)

SCHMIDT, K., H.-J. MICHEL, H.G. HIEKEL, R. FRANKE, A. BARTH: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Acetylcholinesterase-inhibitoren mit Carbamatstruktur;
Pharmazie 32, 522 - 525 (1977)

SMART, J.F.: Potentiation of Suxamethonium by Tacrine (Romotal);
Anaesthesia 19, 524 - 535 (1964)

USDIN, E.: Reactions of Cholinesterases with Substrates, Inhibitors and Reactivators, in: KARCZMAR, A.G., E. USDIN, J.H. WILLS: Anticholinesterase Agents; Pergamon Press,
Oxford - New York - Toronto - Sydney - Braunschweig 1970

WEBB, J.L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors; Vol. I;
Academic Press, New York 1963

WERMUTH, B., U. BRODBECK: Interaction of Proflavine and Acriflavine with Acetylcholinesterase;
Eur. J. Biochem. 37, 377 - 388 (1973)

WILSON, I.B.: Acetylcholinesterase - XI. Reversibility of Tetraethyl Pyrophosphate Inhibition;
J. Biol. Chem. 190, 111 - 117 (1951)

WILSON, I.B., F. BERGMANN: Studies on Cholinesterase - VII. The Active Surface of Acetylcholine Esterase Derived from Effects of pH on Inhibitors; J. Biol. Chem. 185, 479 - 489 (1950)

WILSON, I.B., S. GINSBURG, C. QUAN: Molecular Complementariness as Basis for Reactivation of Alkyl Phosphate - Inhibited Enzyme; Arch. Biochem. Biophys. 77, 286 - 296 (1958)

WILSON, I.B., M.A. HARRISON, S. GINSBURG: Carbamyl Derivates of Acetylcholinesterase; J. Biol. Chem. 236, 1498 - 1500 (1961)

WILSON, I.B., M.A. HATCH, S. GINSBURG: Carbamylation of Acetylcholinesterase; J. Biol. Chem. 235, 2312 - 2315 (1960)

WILSON, I.B., C. QUAN: Acetylcholinesterase Studies on Molecular Complementaries;
Arch. Biochem. Biophys. 73, 131 - 143 (1958)

WINTERINGHAM, F.P.W., R.W. DISNEY: A Radiometric Study of Cholinesterase and its Inhibition;
Biochem. J. 91, 506 - 514 (1964)

WOMBACHER, H., H.U. WOLF: Regulation of Membrane-Bound Acetylcholinesterase Activity by Bisquarternary Nitrogen Compounds;
Mol. Pharmacol. 7, 554 - 566 (1971)

Lebenslauf

27.09.53	Geboren als erster Sohn von Paul und Gisela Jäger in Dörverden/Weser
1960 - 1965	Besuch der Fichteschule (Volksschule) in Hannover
1965 - Juni 1970	Besuch der Stresemannschule (Realschule) in Hannover; Mittlere Reife am 12.06.70
August 1970 - Mai 1973	Besuch der Schillerschule (Gymnasium) in Hannover; Reifeprüfung am 08.05.73
Juli 1973 - Oktober 1974	Zivildienst im Annastift e.V./Hannover (Orthop. Fachklinik, Rehabilitationszentrum)
Oktober 1973 - September 1974	Ausbildung zum Krankenpflegehelfer am Annastift und Henriettenstift/Hannover Staatsexamen am 04.09.74
WS 74/75 - SS 76	Studium der Medizin und Philosophie an der Ruhr - Universität Bochum Ärztliche Vorprüfung im August 1976
WS 76/77 - WS 80/81	Studium der Medizin und Philosophie an der Universität Düsseldorf
August 1977	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1979	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.11.80	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.12.80	Erteilung der Approbation als Arzt
01.02.81	Beginn klinischer Tätigkeit als Assistenzarzt im Ev. Krankenhaus/Herne (Innere Medizin)

Detlev Jäger

Herrn Prof. Dr. Hopf danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Dross für seine wissenschaftlichen Hilfestellungen und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.
Herrn P. Sillmann und Herrn J. Küster danke ich für die Mithilfe bei der Lösung apparativer und technischer Probleme.

DER DRUCKER - (Alte) Buscheystraße 138 - 4630 Bochum-Querenburg